



Universidad de Castilla-La Mancha
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

Aplicación de metodologías quimiométricas a la luminiscencia resuelta en el tiempo

Tesis Doctoral

Fernando Martínez Ferreras

Ciudad Real
2012



Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

Aplicación de metodologías quimiométricas a la luminiscencia resuelta en el tiempo

por

Fernando Martínez Ferreras

Visado en Ciudad Real el de mayo de dos mil doce.

Fdo.: José Antonio Murillo Pulgarín
Catedrático del Departamento de
Química Analítica y Tecnología de
Alimentos de la Universidad de
Castilla-La Mancha.

Trabajo presentado para optar al
Grado de Doctor en Química

Fdo.: Aurelia Alañón Molina
Profesora Titular de Universidad
del Departamento de Química Analítica
y Tecnología de Alimentos de la
Universidad de Castilla-La Mancha

Fdo.: Fernando Martínez Ferreras.
Licenciado en CC. Químicas



D^a. **Justa M^a Poveda Colado**, profesora Titular de Universidad y Secretaria del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Aplicación de metodologías quimiométricas a la luminiscencia resuelta en el tiempo”** constituye la Tesis Doctoral que presenta D. Fernando Martínez Ferreras para aspirar al grado de Doctor en Química, y que ha sido realizada en el Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, cumpliendo todos los requisitos necesarios, bajo la dirección del Dr. D. José Antonio Murillo Pulgarín y la Dra. D^a. Aurelia Alañón Molina.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a de mayo de dos mil doce.

VºBº

Fdo. Ana Isabel Briones Pérez

Fdo. Justa M^a Poveda Colado

Directora del Departamento

Secretaria del Departamento

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a los recursos económicos provenientes de:

- Los proyectos de investigación titulados “Desarrollo de nuevos métodos fluorimétricos y fosforimétricos para la determinación de compuestos de interés farmacológico y medioambiental” (PBI-05-050 y PCI-08-0120), financiados por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y los Fondos FEDER.
- La Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) con referencia AP2007-02715 concedida por el Ministerio de Educación de España.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

- Toda mi familia, y muy especialmente a mis padres, que tanto me han apoyado durante toda mi vida de estudiante.
- Mis directores de Tesis, José Antonio y Aurelia, por aceptarme en su grupo de investigación y por toda la ayuda y asesoramiento proporcionados.
- El Ministerio de Educación, por la Beca de Formación de Profesorado Universitario gracias a la cual he podido financiarme mis estudios de Doctorado.
- Nacho, por sus útiles aplicaciones informáticas y por toda su desinteresada ayuda técnica, especialmente al enseñarme a utilizar el láser del espectrofluorímetro.
- Rosario y Sandra, por su colaboración en la adquisición, control y cuidado de reactivos y material de laboratorio; José Luis, por ayudarme siempre con las numerosas cuestiones burocráticas, y Manolo, por su amabilidad y eficiencia siempre que le enfrentaba con algún problema informático.
- Sonia, Armando, Narjisse, Beatriz, Mar, Carolina, Nieves y el resto de compañeros del Departamento con los que he pasado momentos muy agradables.
- El Profesor Wolfbeis, Hans Heiner y Axel, por aceptarme como un miembro más de su grupo de investigación en Ratisbona y colaborar continuamente en la realización de mi investigación en el extranjero.
- Todos aquellos que me proporcionaron su ayuda, compañía y amistad para que mi estancia en Alemania fuera una experiencia inolvidable, tanto a nivel laboral como personal, especialmente Florian, Andrea, Karola, Sabine, Alexei, Ahmed, Yuanda, Gisela, James, Robert, Michael, Wendy, Lorenz, Dominik, Raphaela y Franziska.

A mis padres

“La ignorancia afirma o niega rotundamente, la ciencia duda.”

Voltaire

Índice

Listado de abreviaturas	23
Objeto	27
Objective	29
<u>Capítulo I: Introducción</u>	31
<u>A. Compuestos analizados</u>	33
A.1. Antibióticos	33
A.1.1. Tetraciclinas	34
<i>A.1.1.1. Introducción histórica</i>	34
<i>A.1.1.2. Propiedades físico-químicas</i>	34
<i>A.1.1.3. Mecanismo de acción</i>	36
<i>A.1.1.4. Reacciones adversas</i>	36
<i>A.1.1.5. Farmacocinética</i>	37
A.2. Antiinflamatorios	37
A.2.1. Introducción histórica	38
A.2.2. Clasificación	40
A.2.3. Mecanismo de acción y efectos farmacológicos	42
A.2.3. Efectos adversos	43
A.2.4. Farmacocinética	44
A.3. Antineoplásicos	44
A.3.1. Clasificación	45
<i>A.3.1.1. Citostáticos que actúan sobre el ADN</i>	45
<i>A.3.1.2. Fármacos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al ADN</i>	46
<i>A.3.1.3. Otros fármacos utilizados contra tumores</i>	46

A.3.2. Antraciclinas	46
A.3.2.1. <i>Introducción histórica</i>	46
A.3.2.2. <i>Mecanismo de acción</i>	48
A.3.2.3. <i>Efectos adversos</i>	49
A.3.2.4. <i>Farmacocinética</i>	49
B. <u>Técnicas luminiscentes</u>	51
B.1. Introducción histórica y clasificación	51
B.2. Etimología de los fenómenos fotoluminiscentes	54
B.2.1. Fosforescencia	54
B.2.2. Fluorescencia	55
B.3. Mecanismo de los procesos fotoluminiscentes	56
B.4. Características de los procesos fotoluminiscentes	61
B.5. Factores estructurales que afectan el rendimiento cuántico de los procesos fotoluminiscentes	63
B.6. Factores ambientales que afectan los procesos luminiscentes	65
B.7. Metodologías luminiscentes utilizadas en esta Tesis	67
B.7.1. Introducción	67
B.7.2. Luminiscencia sensibilizada por lantánidos	68
B.7.2.1. <i>Introducción y mecanismo</i>	68
B.7.2.2. <i>Factores que afectan a la luminiscencia sensibilizada</i>	72
B.7.2.3. <i>Antecedentes bibliográficos</i>	74
B.7.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo	79
B.7.3.1. <i>Antecedentes bibliográficos</i>	84
B.7.3.2. <i>“Dual-Lifetime Referencing” (DLR)</i>	85
<u>Capítulo II: Métodos quimiométricos</u>	93
1. Optimización de métodos químicos de análisis	95
1.1. Optimización secuencial	95
1.2. Optimización por el método de simplex	96
1.2.1. <i>Método de simplex clásicos</i>	96

1.2.2. <i>Método del simplex modificado</i>	100
1.2.3. <i>Método del simplex del centroide ponderado</i>	102
1.2.4. <i>Simplex utilizados en la presente Memoria</i>	104
2. Calibración y regresión	110
2.1. <i>Introducción</i>	110
2.2. <i>Calibración y regresión simples</i>	110
2.2.1. <i>Modelo para la regresión simple</i>	110
2.2.2. <i>Método de mínimos cuadrados</i>	112
2.2.3. <i>Método de las adiciones estándar o calibración interna</i>	116
2.2.4. <i>Comparación de rectas de calibrado. Análisis de varianza</i>	119
2.3. <i>Calibración y regresión multivariantes</i>	122
2.3.1. <i>Introducción</i>	122
2.3.2. <i>Diseño del conjunto de estándares de calibración</i>	124
2.3.3. <i>Métodos de calibración multivariante</i>	128
2.3.3.1 <i>Modelos de avance. Mínimos cuadrados clásicos</i>	129
2.3.3.2. <i>Modelos de retroceso</i>	130
2.3.3.2.1. <i>Regresión lineal múltiple</i>	130
2.3.3.2.2. <i>Regresión por componentes principales (PCR)</i>	132
2.3.3.2.3. <i>Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)</i>	134
2.3.4. <i>Parámetros estadísticos de calidad</i>	136
2.3.5. <i>Selección del número óptimo de factores</i>	140
2.3.6. <i>Detección de puntos discrepantes (“outliers”)</i>	142
2.4. <i>Cálculo del límite de detección (LD)</i>	144

Capítulo III: Disoluciones, instrumentación y

programas informáticos 147

1. <i>Reactivos y disoluciones</i>	149
2. <i>Instrumentación</i>	152
2.1. <i>Espectrofluorímetro de barrido SLM Aminco Bowman Series 2</i>	152
2.2. <i>Espectrofluorímetro de barrido Photon Technology International (PTI)</i>	155
2.3. <i>Instrumentación para “Dual-Lifetime Referencing”</i>	159
2.4. <i>Otros aparatos utilizados</i>	161

3. Programas informáticos	162
3.1. Software para la elaboración de gráficos	162
3.2. Software para la representación de estructuras químicas	163
3.3. Ftotal para la representación de espectros tridimensionales	164
3.4. Felix32 para la obtención de curvas de decaimiento luminiscente y el cálculo de tiempos de vida	166
3.5. Software empleado para la optimización mediante simplex	170
3.6. Software empleado para la regresión multivariante	171
3.7. Software para la generación de números aleatorios	175
3.8. Software para la obtención de parámetros estadísticos	175

Capítulo IV: Determinación de doxiciclina y clortetraciclina

mediante luminiscencia sensibilizada por europio **177**

Abstract	179
1. Generalidades	181
2. Características espectrales de los analitos	182
3. Estudio de los tiempos de vida de luminiscencia	185
4. Estabilidad de las disoluciones	187
5. Optimización secuencial de variables	187
5.1. Optimización de variables químicas	187
5.1.1. <i>Influencia de la presencia de EDTA y/o CTACl.</i> <i>Optimización del pH</i>	188
5.1.2. <i>Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima</i>	191
5.1.3. <i>Optimización de la concentración de europio</i>	193
5.1.4. <i>Optimización de la concentración de EDTA</i>	195
5.1.5. <i>Optimización de la concentración de CTACl</i>	197
5.1.6. <i>Influencia de la temperatura</i>	198
5.2. Optimización de variables instrumentales	199
5.2.1. <i>Optimización del tiempo de integración</i>	200
5.2.2. <i>Optimización del número de disparos</i>	201
5.2.3. <i>Optimización del número de medias</i>	203

5.2.4. Optimización de la frecuencia de destellos	204
5.2.5. Optimización del número de canales	206
5.2.6. Selección del modo de adquisición	207
6. Estudio de la linealidad	208
7. Aplicación del modelo PLS-1	210
7.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración	210
7.1.1. Intervalo temporal óptimo	213
7.1.2. Número de factores óptimo	214
7.1.3. Datos discrepantes	215
7.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)	216
8. Estudio de los límites de detección	220
9. Estudio de la precisión del método	221
10. Aplicaciones del método propuesto	222
10.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas	222
10.2. Aplicación a muestras de orina humana	224

Capítulo V: Determinaciones binarias de fenamatos mediante

luminiscencia sensibilizada por terbio	233
Abstract	235
1. Generalidades	237
2. Características espectrales de los analitos	239
3. Estudio de los tiempos de vida de luminiscencia	243
<u>A. Determinación de los ácidos mefenámico y flufenámico</u>	247
A. 1. Antecedentes bibliográficos	247
A. 2. Estabilidad de las disoluciones	250
A. 3. Optimización secuencial de variables	250
A.3.1. Optimización de variables químicas	250
A.3.1.1. pH de la disolución	251
A.3.1.2. Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima	253
A.3.1.3. Optimización de la concentración de terbio	255

A.3.1.4. Optimización de la concentración de TOPO y del porcentaje de etanol	256
A.3.1.5. Optimización de la concentración de Tritón X-100	258
A.3.1.6. Influencia de la temperatura	259
A.3.2. Optimización de variables instrumentales	260
A.3.2.1. Optimización del tiempo de integración	261
A.3.2.2. Optimización del número de disparos	262
A.3.2.3. Optimización del número de medias	264
A.3.2.3. Optimización de la frecuencia de la lámpara	265
A.3.2.4. Optimización del número de canales	267
A.3.2.5. Selección del modo de adquisición	268
A.4. Estudio de la linealidad	269
A.5. Aplicación del modelo PLS-1	271
A.5.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración	271
A.5.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)	275
A.6. Cálculo de los límites de detección	280
A.7. Estudio de la precisión del método	281
A.8. Estudio de la selectividad del método	282
A.9. Aplicaciones del método propuesto	284
A.9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas	284
A.9.2. Aplicación a muestras de orina humana	286
B. <u>Determinación de los ácidos mefenámico y tolfenámico</u>	291
B.1. Antecedentes bibliográficos	291
B.2. Estabilidad de las disoluciones	292
B.3. Optimización secuencial de variables	293
B.3.1. Optimización de variables químicas	293
B.3.1.1. pH de la disolución	293
B.3.1.2. Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima	295
B.3.1.3. Optimización de la concentración de terbio	296
B.3.1.4. Optimización de la concentración de TOPO	

<i>y del porcentaje de etanol</i>	297
<i>B.3.1.5. Optimización de la concentración de Tritón X-100</i>	299
<i>B.3.1.6. Influencia de la temperatura</i>	300
B.3.2. Optimización de variables instrumentales	301
<i>B.3.2.1. Optimización del tiempo de integración</i>	302
<i>B.3.2.2. Optimización del número de disparos</i>	303
<i>B.3.2.3. Optimización del número de medias</i>	304
<i>B.3.2.3. Optimización de la frecuencia de la lámpara</i>	306
<i>B.3.2.4. Optimización del número de canales</i>	307
<i>B.3.2.5. Selección del modo de adquisición</i>	308
B.4. Estudio de la linealidad	309
B.5. Aplicación del modelo PLS-1	312
B.5.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración	312
B.5.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)	315
B.6. Cálculo de los límites de detección	320
B.7. Estudio de la precisión del método	320
B.8. Estudio de la selectividad del método	321
B.9. Aplicaciones del método propuesto	323
B.9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas	323
B.9.2. Aplicación del método a muestras de orina humana	325

Capítulo VI: Determinación de nabumetona y su principal

metabolito por fluorescencia resuelta en el tiempo	329
Abstract	331
1. Generalidades	333
2. Características espectrales de los analitos y estudio de sus curvas de decaimiento	338
3. Estabilidad de las disoluciones	342
4. Optimización de variables	342
4.1. Optimización secuencial de variables químicas	343
4.1.1. <i>Porcentaje de etanol</i>	343

4.1.2. Selección del pH óptimo y de la naturaleza y concentración del tampón	344
4.1.3. Influencia de la temperatura	346
4.2. Optimización de variables instrumentales	347
4.2.1. Optimización secuencial	347
4.2.1.1. Optimización del tiempo de integración	348
4.2.1.2. Optimización de la frecuencia de disparos	349
4.2.2. Optimización simplex	350
4.2.2.1. Optimización simplex para la nabumetona	352
4.2.2.2. Optimización simplex para el 6-MNA	355
5. Estudio de la linealidad	360
6. Aplicación del modelo PLS-1	362
6.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración	362
6.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)	366
7. Cálculo de los límites de detección	370
8. Estudio de la precisión del método	371
9. Estudio de la selectividad del método	372
10. Aplicaciones del método propuesto	374
10.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas	374
10.2. Aplicación del método a muestras de orina humana	375
 Capítulo VII: Determinación de dos metabolitos principales de la aspirina por fluorescencia resuelta en el tiempo	 389
Abstract	391
1. Generalidades	393
2. Características espectrales de los analitos y estudio de sus curvas de decaimiento	397
3. Estabilidad de las disoluciones	402
4. Optimización de variables	403
4.1. Optimización secuencial de variables químicas	403
4.1.1. Selección del pH óptimo y de la naturaleza	

<i>y la concentración del tampón</i>	403
4.1.2. <i>Influencia de la temperatura</i>	405
4.2. Optimización de variables instrumentales	406
4.2.1. <i>Optimización secuencial</i>	406
4.2.1.1. <i>Optimización del tiempo de integración</i>	406
4.2.1.2. <i>Optimización de la frecuencia</i>	408
4.2.2. <i>Optimización simplex</i>	410
4.2.2.1. <i>Optimización simplex para el ácido salicílico</i>	411
4.2.2.2. <i>Optimización simplex para el ácido gentísico</i>	415
5. Estudio de la linealidad	419
6. Aplicación del modelo PLS-1	421
6.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración	421
6.1.1. <i>Intervalos temporales óptimos</i>	424
6.1.2. <i>Número de factores óptimo</i>	424
6.1.3. <i>Datos discrepantes</i>	424
6.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)	425
7. Cálculo de los límites de detección	430
8. Estudio de la precisión del método	430
9. Aplicaciones del método propuesto	431
9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas	431
9.2. Aplicación del método a muestras de orina humana	433
 <u>Chapter VIII: Dual lifetime referenced fluorometry</u>	
for the determination of doxorubicin in urine	443
Abstract	445
1. Introduction	447
2. Reagents and preparation of samples	449
3. Fluorescent characteristics of the analyte and the reference	451
4. Optimization of variables	452
4.1. Optimization of pH and buffer solution	452
4.2. Optimization of instrumental settings	453

4.2.1. <i>Frequency-domain DLR</i>	453
4.2.2. <i>Time-domain DLR</i>	455
5. Calculation of the lifetime of the reference. Calibration	456
5.1. Frequency-domain DLR	456
5.2. Time-domain DLR	459
6. Limits of detection	462
7. Determination of doxorubicin in urine	463
 Conclusiones	 469
Conclusions	473
 Referencias	 475

Listado de las abreviaturas utilizadas en esta Tesis

6-MNA: ácido 6-metoxi-2-naftilacético.

AB2: “Aminco Bowman Series 2”.

ADN: ácido desoxirribonucleico

AINE: antiinflamatorio no esteroideo.

AF: ácido flufenámico.

AG: ácido gentísico.

AM: ácido mefenámico.

ARN: ácido ribonucleico.

AS: ácido salicílico.

AT: ácido tolfenámico.

b: pendiente.

CCD: dispositivo de carga acoplada.

CLS: mínimos cuadrados clásicos.

COX: enzima ciclooxigenasa.

CTABr: bromuro de cetiltrimetilamonio.

CTACl: cloruro de cetiltrimetilamonio.

CTC: clortetraciclina.

DC: doxiciclina.

DLR: “Dual-Lifetime Referencing”.

DW: parámetro de Durbin-Watson.

EDTA: ácido etilendiamintetraacético.

Φ : rendimiento cuántico de luminiscencia / desfase.

FIA: análisis por inyección en flujo.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

ILS: mínimos cuadrados inversos.

IRF: función de respuesta instrumental.

IUPAC: “International Union of Pure and Applied Chemistry”.

LD: límite de detección.

LED: diodo emisor de luz.

LOD: “Limit of Detection”.

MC: mínimos cuadrados.

MCP: mínimos cuadrados ponderados.

MS: espectrometría de masas.

MVC1: rutina para la regresión multivariante de primer orden.

NABU: nabumetona.

Ru(ddd)₃: rutenio(II)tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolina).

PAN: poliacrilonitrilo.

PCA: análisis de componentes principales.

PCR: regresión por componentes principales / reacción en cadena de la polimerasa.

PLS: regresión por mínimos cuadrados parciales.

PRESS: suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados.

PTI: “Photon Technology International”.

R²: coeficiente de la determinación / coeficiente de correlación múltiple.

REP: error relativo de predicción.

RMS: valor cuadrático medio.

RMSD: desviación estándar media residual.

RMSECV: error cuadrado medio de la validación cruzada.

RSR: resonancia de scattering Rayleigh.

S₀: estado singlete fundamental.

S₁: estado singlete excitado 1.

S₂: estado singlete excitado 2.

s_b: desviación estándar del blanco.

s_d: desviación estándar.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SEP: error estándar de predicción.

τ: tiempo de vida.

T₁: estado triplete excitado 1.

TC: tetraciclina.

TOPO: óxido de trioctilfosfina.

TCSPC: “Time-Correlated Single-Photon Counting”.

UV: ultravioleta.

\bar{x} : valor medio.

OBJETO DE LA TESIS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar metodologías luminiscentes resueltas en el tiempo, combinadas con métodos quimiométricos, y aplicarlas a la determinación de compuestos de interés farmacológico (antibióticos, antiinflamatorios y anticancerígenos) en muestras reales. Por tanto, será necesario:

- Abir una nueva línea de investigación consistente en la aplicabilidad de la luminiscencia sensibilizada por lantánidos a la determinación de analitos poco luminiscentes en estado nativo.
- Seleccionar como señales analíticas las curvas de decaimiento luminiscente, a fin de demostrar su utilidad en la determinación simultánea de analitos cuyos espectros de luminiscencia se hallan fuertemente solapados.
- Desarrollar un procedimiento de optimización de variables mediante la combinación de varias modificaciones del método simplex.
- Estudiar las ventajas de los métodos de calibración multivariante en la determinación de analitos muy similares sin necesidad de separación previa.
- Investigar la técnica de patrón interno conocida como “Dual-Lifetime Referencing” (DLR), con la finalidad de evaluar por primera vez su posible utilidad en la determinación de analitos en disolución.
- Demostrar la validez de los métodos desarrollados, mediante su aplicación a la determinación de los diferentes analitos en preparaciones farmacéuticas y en fluidos biológicos.

OBJECTIVE

The general objective of this Thesis is the development of time-resolved luminescence methods, combined with Chemometrics, and their application to the determination of analytes of pharmaceutical interest (antibiotics and anti-inflammatories) in medicines and urine samples. In order to achieve this aim:

- A new line of investigation will be opened in our group. It will be directed towards the applicability of lanthanide-sensitized luminescence to the determination of analytes that show negligible native luminescence.
- Luminescence decay curves of the analytes will be selected as the analytical signals, so as to prove their usefulness in the simultaneous determination of analytes with strongly overlapped spectra.
- A procedure to optimize variables, based on several modifications of the technique of simplexes, will be applied.
- The advantages of multivariate calibration methods in the determination, without previous separation, of very similar analytes will be studied.
- Dual-Lifetime Referencing, a self-referenced technique previously used in the context of sensors, will be investigated with the aim of assessing for the first time its possible extension to the quantification of fluorophores in solution.
- The developed methods will be applied to the determination of analytes in pharmaceutical preparations and human urine to demonstrate their validity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

A. COMPUESTOS ANALIZADOS

A.1. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas capaces de inhibir procesos vitales de ciertos organismos, generalmente bacterias. Aunque los primeros antibióticos procedían de seres vivos, la mayoría de los usados hoy son derivados sintéticos. Estos compuestos se denominan “bacteriostáticos” si impiden el crecimiento de los gérmenes, y “bactericidas” si provocan, además, su muerte. De ahí que el término “antibiótico”, acuñado en 1889 por Paul Vuillemin, discípulo de Louis Pasteur, signifique literalmente “contra la vida” (del griego *αντι* + *βιος*).

La mayoría de los antibióticos no tienen uso práctico, ya que son igual de tóxicos para todos los organismos. Sin embargo, un grupo relativamente pequeño puede usarse en medicina humana, veterinaria u horticultura para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a que sus miembros presentan toxicidad selectiva, es decir, siempre que se administren en dosis adecuadas, afectan en gran medida a los organismos invasores pero de forma totalmente despreciable a los huéspedes. Es más, en la mayoría de los casos un determinado antibiótico no afecta a todos los microorganismos invasores, sino sólo al grupo determinado de gérmenes que se encuentra dentro de su “espectro de actividad”.

Existen numerosos criterios para la clasificación de los antibióticos, como por ejemplo su origen, su estructura química o el nombrado espectro de actividad. Una clasificación un tanto general, pero muy útil debido a su simplicidad, es aquella que tiene en cuenta la acción que posee cierto antibiótico a una concentración determinada:

- Antibióticos con acción bactericida poco influenciada por la concentración, como los betalactámicos y los glucopéptidos.

- Antibióticos con acción bactericida dependiente de la concentración, como los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas.
- Antibióticos que se comportan principalmente como bacteriostáticos, como los macrólidos, las tetraciclinas y el cloranfenicol.

Se trata a continuación exclusivamente acerca de las tetraciclinas, debido a que es el grupo de antibióticos al cual pertenecen dos de los analitos determinados en la presente Tesis.

A.1.1. Tetraciclinas

A.1.1.1. Introducción histórica

En 1945, el doctor Benjamin Dugger, de la Universidad de Missouri Columbia, descubrió en el hongo *Streptomyces aureofaciens* la primera tetraciclina, conocida como clortetraciclina. Poco después se aisló también la oxitetraciclina del hongo llamado *Streptomyces rimosus*. Ambos compuestos mostraron tal eficacia como antibióticos que se extendió rápidamente su uso y se multiplicaron las investigaciones relacionadas con las tetraciclinas, convirtiéndose en uno de los grupos de compuestos antibacterianos más estudiados en la actualidad.

A.1.1.2. Propiedades físico-químicas

El representante genérico del grupo es la tetraciclina, que puede extraerse del hongo *Streptomyces viridifaciens*, aunque también es posible su producción semisintética, a partir de la hidrogenólisis de la 7-clortetraciclina. El nombre sistemático de la tetraciclina es 2-(amino-hidroximetiliden)-4-dimetilamino-6,10,11,12-tetrahidroxi-6-metil-4,4,5,5-tetrahidrotetracen-1,3,12-triona, y su estructura química se muestra en la figura A.1.

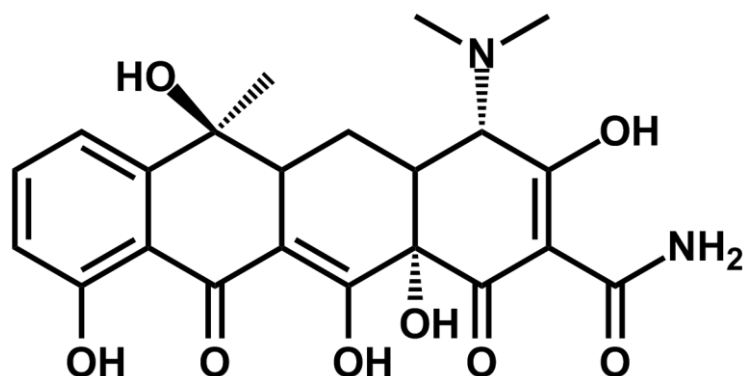


Figura A.1. Estructura química de la tetraciclina.

Todos los miembros de la familia de las tetraciclinas derivan de esta misma estructura, de la cual pueden deducirse las siguientes propiedades fisicoquímicas generales:

- **Carácter anfótero** debido a la presencia en su estructura de tres o incluso cuatro grupos ionizables, con pK_a aproximados de 3,3; 7; 9 y 13. Debido a ello, muchas tetraciclinas forman sales solubles en agua, tanto con ácidos como con bases fuertes.
- **Propiedades quelatantes.** Puesto que su estructura contiene grupos que pueden formar puentes de hidrógeno, las tetraciclinas dan lugar a complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio. También forman complejos con lantánidos fácilmente, siendo esto clave para uno de los trabajos presentados en esta Tesis.
- **Inactivación a pHs extremos.** Ácidos y bases fuertes conducen a la formación de anhidrotetraciclinas e isotetraciclinas, respectivamente, lo cual implica la pérdida de su actividad antibacteriana.
- **Color amarillento** causado por su sistema de anillos común.
- **Débil fluorescencia** cuando son irradiadas con luz ultravioleta.

A.1.1.3. Mecanismo de acción

Las tetraciclinas actúan principalmente como antibióticos bacteriostáticos a las dosis habituales, aunque a altas dosis pueden funcionar como bactericidas, especialmente con microorganismos particularmente susceptibles. La inhibición del crecimiento bacteriano tiene lugar por varios mecanismos:

- Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa de las bacterias.
- Inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma bacteriano, debido a la unión con la subunidad 30S del mismo, lo cual impide el acoplamiento del ARN de transferencia y el transporte de aminoácidos hasta la subunidad 50S.
- Presunta alteración de la membrana plasmática de los organismos susceptibles, provocando la salida de componentes intracelulares.

El espectro antibacteriano de las tetraciclinas es muy amplio. Resultan efectivas frente a infecciones causadas por numerosas especies de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas (*Espiroquetas*, *Rickettsias*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Brucellas*, *Escherichia coli*, *Bordetella...*)

La resistencia bacteriana a las tetraciclinas aparece, en general, muy lentamente. Sin embargo, parece deberse a la acción de plásmidos, hecho que puede implicar el desarrollo de resistencia simultánea a otro tipo de antibióticos. Por ello, hoy en día hay cierta reticencia en el uso hospitalario de las tetraciclinas.

A.1.1.4. Reacciones adversas

Las reacciones adversas que pueden aparecer como consecuencia de la administración de tetraciclinas tienen una incidencia muy baja (en algunos casos, incluso inferior al 0,1%). La más frecuente es la hipersensibilidad dental al calor. Otros efectos indeseados menos frecuentes incluyen, por ejemplo, dolor de cabeza, náuseas y

vómitos, gastroenteritis y colitis no infecciosa, fotosensibilidad cutánea, faringitis aguda y anemia hemolítica.

A.1.1.5. Farmacocinética

Las tetraciclinas se absorben rápida y completamente en el tubo digestivo (especialmente en el intestino delgado), alcanzando su máxima concentración en sangre en un plazo de entre tres y seis horas después de su administración por vía oral. Su unión a proteínas plasmáticas depende de la estructura concreta de cada tetraciclina. Se distribuyen por todos los tejidos, especialmente por el tejido óseo, y penetran en el interior de las células. Son capaces de atravesar, así mismo, la placenta, debido a lo cual su uso no está recomendado a mujeres embarazadas. Se metabolizan por todo el organismo de forma parcial. Sin embargo, la mayor parte se elimina de forma inalterada con la orina y a veces también con las heces. Algunas tetraciclinas pueden reabsorberse en los riñones, efecto que puede alargar su vida media hasta incluso más de quince horas.

A.2. Antiinflamatorios

El término “antiinflamatorio” engloba a una amplia familia de medicamentos usados para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos, generalmente mediante la inhibición de la biosíntesis de eicosanoides o derivados del ácido araquidónico.

Los medicamentos antiinflamatorios se dividen en dos grandes grupos: esteroideos y no esteroideos. Los esteroideos son corticoides (especialmente, glucocorticoides), es decir, hormonas naturales o sintéticas que, entre otras muchas propiedades, son capaces de revertir el proceso de inflamación, o incluso de prevenir que éste tenga lugar. Los antiinflamatorios esteroideos más usados son la dexametasona y la prednisona, ambos sintéticos. Su uso se encuentra muy limitado debido a sus numerosos y graves efectos secundarios.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son mucho menos peligrosos y, por tanto, más usados. A continuación se trata de ellos más extensamente, debido a la importante presencia que tienen en gran parte del trabajo experimental presentado en esta Memoria.

A.2.1. Introducción histórica

El primer AINE, un glucósido amargo llamado salicina, fue aislado en 1829 por el farmacéutico francés Henri Leroux de la corteza del tronco del sauce blanco (de ahí su nombre). Sin embargo, las propiedades antiinflamatorias de preparaciones elaboradas con corteza de sauce se conocían desde tiempos muy antiguos, incluso por Hipócrates (460-377 a. C.)

La hidrólisis de la salicina da como resultado glucosa y alcohol salicílico. Este último puede transformarse en ácido salicílico o salicilato, bien *in vivo*, bien mediante manipulación química (la llamada reacción de Kolbe-Schmitt). El ácido salicílico es mucho más efectivo que la salicina como agente antiinflamatorio y además posee propiedades analgésicas. Sin embargo, tiene la desventaja de ser corrosivo para la mucosa del estómago.

Este inconveniente pudo ser corregido en gran parte bloqueando el grupo ácido de la molécula mediante acetilación, dando lugar al ácido acetilsalicílico. El químico alemán Felix Hoffmann, que trabajaba para la casa Bayer, ideó un método para producir este último compuesto con gran pureza, lo cual permitió su comercialización bajo el nombre “aspirina” en 1915.

Sin embargo, se comprobó que el ácido acetilsalicílico también presenta efectos gastrointestinales adversos, aunque en mucha menor medida que el ácido salicílico. La investigación encaminada a tratar de solventar completamente esta desventaja dio lugar al desarrollo de toda la familia de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos a lo largo del siglo XX.

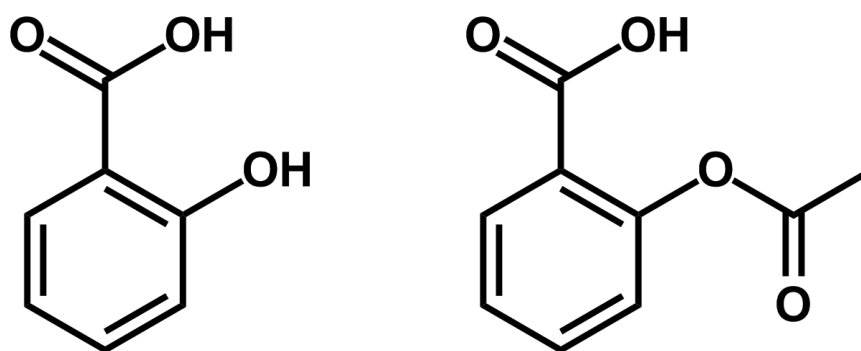


Figura A.2. Estructuras químicas del ácido salicílico (izquierda) y del ácido acetilsalicílico (derecha).

La familia de los AINEs llegó a contener tal número de compuestos que en la década de 1970 comenzaron a surgir conflictos e indecisiones con respecto a cuál era mejor administrar. Este hecho explica que comenzaran entonces numerosos estudios para conocer a fondo tanto el mecanismo farmacocinético como la respuesta clínica de cada uno de los AINEs. Particularmente importante fue el descubrimiento del papel de las prostaglandinas en procesos febriles, circulación sanguínea, dolor, contracciones uterinas y secreciones gástricas.

En 1971, el farmacólogo británico Robert Vane publicó sus observaciones acerca del efecto inhibitorio que la aspirina ejerce sobre la enzima ciclooxigenasa (COX) y la consiguiente disminución en la producción de prostaglandinas. Como consecuencia, se produce también la desaparición del dolor, ya que las prostaglandinas son mediadores del dolor por acción directa sobre terminaciones nerviosas, y además producen la activación de otros mediadores locales del dolor y la inflamación, como la histamina. La repercusión de este descubrimiento fue de tal magnitud que se consideró a Vane merecedor del Premio Nobel de Medicina en 1982.

A principios de la década de 1990 se observó que existían dos tipos de COX, codificados incluso por dos genes diferentes: la COX-1, cuya inhibición está relacionada con los efectos adversos de los AINEs, y la COX-2, de cuya inhibición surgen las propiedades antiinflamatorias. A raíz de este descubrimiento, recientemente

se ha sintetizado el grupo de AINE conocido como “Coxibs”, el cual inhibe selectivamente la COX-2. Ejemplos de este grupo son el meloxicam y la nimesuida. Sin embargo, estos nuevos medicamentos parecen aumentar el riesgo de sufrir ataques al corazón.

Actualmente, los antiinflamatorios no esteroideos son el grupo de fármacos más vendido en todo el mundo, con una producción anual de varias toneladas, si bien aún continúa la búsqueda del analgésico y antiinflamatorio ideal.

A.2.2. Clasificación

Como ya se ha comentado, la familia de los AINEs está compuesta por innumerables agentes, cuya síntesis e incorporación al mercado farmacológico se produce permanentemente. Tras los últimos descubrimientos y estudios, se está desarrollando actualmente una clasificación atendiendo a la selectividad de los AINEs frente a la inhibición de COX-1 y/o COX-2. Sin embargo, la clasificación más usada todavía es la basada en la estructura molecular de los fármacos:

- **Salicilatos:** son los derivados del ácido salicílico. Poseen un buen efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Sin embargo, pueden provocar úlceras y trastornos ácidos. Dentro de esta familia se encuentran compuestos como el ácido acetilsalicílico (aspirina), el diflunisal, el salsalato, la salicilamida o el benorilato.
- **Pirazolonas,** como la fenilbutazona (retirada por su toxicidad hematológica), la bumadizona, la oxifenbutazona, la clofenazona o la suxibuzona. Poseen acciones analgésicas y antipiréticas semejantes a los del grupo anterior, pero sus propiedades antiinflamatorias son mayores. Debido a ello, se usan principalmente como antireumáticos.
- **p-aminofenoles:** fenacetina (prohibida por ser tóxica para el riñón) y paracetamol. Este último compuesto es predominantemente antipirético y

analgésico. Sus propiedades antiinflamatorias son menores que las de la aspirina, si bien generalmente produce una menor irritación gástrica.

- **Indoles:** indometacina, benzidamina, sulindac, acemetacina, proglumetacina, talmetacina... La indometacina, el más usado de este grupo, es uno de los AINEs más potentes, pero también más tóxicos.
- **Derivados acéticos:** diclofenaco, aceclofenaco, etodolaco, ketoloraco... Son semejantes a las pirazolonas en cuanto a su actividad.
- **Fenamatos:** su acción es más antiinflamatoria que analgésica y antipirética. Miembros de este grupo son el ácido flufenámico, el ácido tolfenámico, el ácido mefenámico, el ácido meclofenámico o el ácido niflúmico.
- **Derivados propiónicos:** ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, indoprofeno, fenoprofeno... Poseen efectos analgésicos similares a los de la aspirina, aunque sus efectos antiinflamatorios y antipiréticos son inferiores.
- **Oxicames:** más antiinflamatorios que analgésicos, su mayor ventaja es su larga vida media, lo cual permite reducir su administración a sólo una toma diaria. Ejemplos de miembros son: piroxicam, tenoxicam, sudoxicam, isoxicam o meloxicam.
- **Derivados nicotínicos:** Clonixiato de lisina e isonixina.
- **Derivados de la naftilalcalona:** destaca la nabumetona, un profármaco que se transforma en gran parte en el organismo en su metabolito activo (el ácido 6-metoxi-2-naftilacético o 6-MNA), el cual posee actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias.
- **Derivados de ácidos heterocíclicos:** oxaprozina.
- **Derivados de la sulfonanilida:** nimesulina.

- **Derivados de las benzoxazocinas:** destaca el nefopam, muy poco usado debido a la gran cantidad de efectos secundarios que puede producir (náuseas, vómitos, dolor epigástrico, sequedad bucal, retención urinaria, mareos, confusión, taquicardia...)

A.2.3. Mecanismos de acción y efectos farmacológicos

En general, los AINEs en dosis únicas son analgésicos efectivos en el tratamiento del dolor moderado de origen somático (músculo esquelético), postoperatorio, visceral y óseo. En dosis continuadas son eficaces contra el dolor y la inflamación en enfermedades reumáticas (espondiloartropatías inflamatorias, artritis reumatoide, artrosis,...). También presentan acción antipirética y antiagregante plaquetaria.

- La **acción analgésica**, como ya se indicó, se debe a la inhibición de la enzima COX-2, y, por tanto, de la síntesis de prostaglandinas. En consecuencia, los AINEs son especialmente eficaces cuando el dolor está asociado a inflamaciones crónicas o agudas. La inhibición de las enzimas COX puede ser reversible competitiva (ibuprofeno), reversible no competitiva (paracetamol) o irreversible (ácido acetilsalicílico). La acción analgésica presenta una dosis máxima, por encima de la cual únicamente aumentan los efectos secundarios.
- La **acción antipirética** es consecuencia de la inhibición de prostaglandinas en el hipotálamo, glándula endocrina relacionada con la regulación de la temperatura corporal.
- La **acción antiinflamatoria** se debe no sólo a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, sino también a la modificación de otros mediadores de la inflamación, como los radicales oxígeno, las citocinas, las cininas o las aminas vasoactivas.
- Acción **antiagregante plaquetaria**, puesto que las prostaglandinas están también involucradas en el proceso de coagulación de la sangre.

- Estudios actuales parecen indicar que las prostaglandinas participan también en el **Alzheimer** y el **cáncer**, por lo que los AINEs podrían utilizarse en el futuro para su tratamiento.

A.2.3. Efectos adversos

En general, los antiinflamatorios no esteroideos son fármacos muy seguros. Sin embargo, su amplia administración ha permitido que se observen ciertos efectos secundarios, siendo los más frecuentes los que afectan al sistema gastrointestinal y a los riñones.

- Los **efectos gastrointestinales** se deben a que las prostaglandinas colaboran en la protección de la mucosa gástrica al limitar la secreción ácida y estimular la formación de mucus, de tal forma que la administración de AINEs está asociada a una disminución de la protección del estómago y los intestinos a ácidos. Las consecuencias pueden ser náuseas, dolor abdominal, disminución del apetito, gastritis, indigestión, diarrea, hemorragia digestiva o úlcera gastroduodenal. Sin embargo, no todos los AINEs presentan estos efectos indeseables en la misma medida. Así, mientras que el ácido salicílico los presenta en alto grado, el paracetamol no los presenta en absoluto.
- **Efectos cardiovasculares y renales:** por causas aún no muy claras, la mayoría de los AINEs producen un aumento de hasta 5 mm de mercurio en la presión arterial, por lo que no deben administrarse a pacientes que sufran de hipertensión. Además, muchos de estos medicamentos aumentan considerablemente el riesgo de infarto de miocardio y de insuficiencia cardíaca en pacientes susceptibles.

Por otra parte, la reducción en la producción de prostaglandinas vasodilatadoras en los riñones conlleva la retención de sales y agua. En consecuencia la administración de AINEs puede conducir a un fallo renal agudo en pacientes con problemas renales.

- **Hipersensibilidad:** pueden darse reacciones alérgicas a los AINEs, con síntomas como erupciones cutáneas, rinitis, asma bronquial o diarrea.
- **Efectos nerviosos:** los AINEs pueden afectar el sistema nervioso central, especialmente en niños, en forma de irritabilidad, cefaleas, mareos y somnolencia.
- **Toxicidad hepática:** no es común, excepto para el caso del paracetamol, y casi en todos los casos debido a la administración accidental de una sobredosis.
- **Efectos hematológicos:** debido a la ya comentada disminución de la agregación plaquetaria, los AINEs pueden producir neutropenia y anemia.
- **Síndrome de Reye,** un trastorno mitocondrial, más frecuente en niños que en adultos, relacionado en la mayoría de los casos con la exposición a salicilatos.

A.2.4. Farmacocinética

En general, todos los AINEs se absorben casi por completo tras su administración oral, la cual se recomienda junto con alimentos a fin de reducir los efectos gastrointestinales adversos. Presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas y una buena metabolización hepática. Su vida media suele ser inferior a las ocho horas (excepto para el caso de los oxicams, que puede ser de hasta veinticuatro horas), y normalmente se excretan en la orina.

A.3. Antineoplásicos

Los antineoplásicos o antitumorales son sustancias que impiden la aparición, el crecimiento y la proliferación de células tumorales malignas. Se trata de un grupo muy amplio y heterogéneo de sustancias de origen natural, sintético o semisintético. Muchos de los antineoplásicos son profármacos, los cuales se metabolizan en el organismo

dando lugar a los principios activos. La clasificación generalmente se hace atendiendo al mecanismo de acción y, dentro de éste, a la estructura química de las moléculas.

A.3.1. Clasificación

Los antineoplásicos suelen clasificarse en tres grandes grupos:

A.3.1.1. *Citostáticos que actúan sobre el ADN*

- **Agentes alquilantes:** incluyen las llamadas mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan,...) y las nitrosoureas (como la carmustina). La ciclofosfamida particularmente se utiliza en el tratamiento de un gran número de tumores debido a su amplio espectro.
- **Platinos:** son complejos de metales pesados, y se administran de forma intravenosa. El más conocido es el cisplatino, utilizado, por ejemplo, para tratar cánceres de pulmón, estómago, testículo u ovario. Otros miembros de este grupo son el carboplatino y el oxiplatino.
- **Antimetabolitos:** metotrexato, fluorouracilo, gemcitabina, fludarabina... Se deben usar con precaución, ya que todos son depresores de la médula ósea.
- **Antibióticos antitumorales o antraciclinas:** doxorubicina, epirubicina, bleomicina...
- **Inhibidores de las topoisomerasas** (enzimas que controlan la replicación del ADN): irinotecan, etoposido, teniposido...
- **Enzimas:** L-asparaginasa, utilizada en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en niños.

A.3.1.2. Fármacos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al ADN

- **Alcaloides de la vinca:** destacan la vinblastina, la vincristina y la vinorelbina. Deben administrarse con precaución puesto que son agentes tóxicos para los folículos pilosos.
- **Taxanos:** como paclitaxel y docetaxel. Suelen dar lugar a reacciones de hipersensibilidad.

A.3.1.3. Otros fármacos utilizados contra tumores

- **Agentes hormonales:** pueden ser antiestrogénicos, antiandrogénicos, glucocorticoides...
- **Sistema inmunitario:** interleucinas, interferones, anticuerpos monoclonales,...

Se tratará a continuación algo más extensamente acerca de las antraciclinas, ya que a este grupo pertenece la doxorubicina, analito determinado en un trabajo de la presente Tesis.

A.3.2. Antraciclinas

A.3.2.1. Introducción histórica

En la década de 1950, los laboratorios italianos Farmitalia comenzaron una investigación encaminada a tratar de aislar compuestos anticancerígenos a partir de microorganismos que habitan en suelos. En una muestra tomada de la zona de Castel del Monte, un castillo del siglo XIII de Apulia, se encontró una nueva cepa de la actinobacteria *Streptomyces peucetius* y de ella se aisló un pigmento rojo que demostró

ser muy eficaz frente a tumores en ratones. Unos investigadores franceses descubrieron el mismo compuesto casi simultáneamente, y ambos grupos se pusieron de acuerdo para llamarlo daunorrubicina (combinando “dauni”, una antigua tribu romana de Apulia, y “rubis”, rubí en francés, debido a su color rojizo).

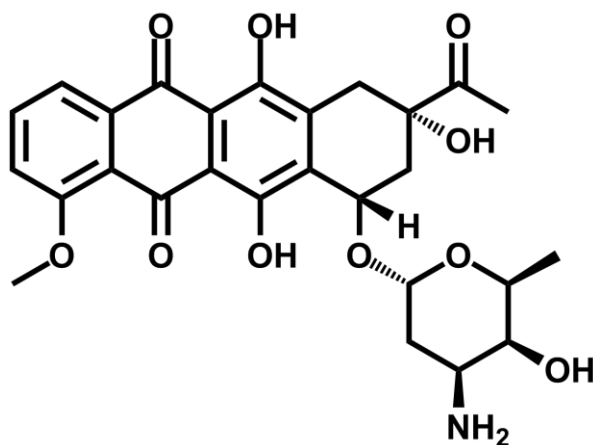


Figura A.3. Estructura química de la daunorrubicina.

Las pruebas clínicas de la daunorrubicina, la primera antraciclina descubierta, comenzaron en la década de 1960, y su efectividad en el tratamiento de la leucemia y el linfoma quedó demostrada, si bien en 1967 se encontró que la administración de este compuesto es extremadamente tóxica para el tejido cardíaco.

Sin embargo, los investigadores de Farmitalia descubrieron poco después que la actividad biológica del fármaco podía modificarse fácilmente introduciendo pequeños cambios en su estructura. Así, se indujo una mutación en una cepa de *Streptomyces* utilizando N-nitroso-N-metil uretano, y de esta cepa se aisló un pigmento diferente a la daunorrubicina, aunque también de tonalidad intensamente rojiza. Se llamó a este nuevo compuesto adriamicina (debido a la proximidad de los laboratorios al mar Adriático), aunque posteriormente se cambió su nombre a doxorubicina para continuar con la nomenclatura sistemática establecida por su antecesora. La doxorubicina mostró mejor actividad que la daunorrubicina frente a tumores en ratones, aunque la cardiotoxicidad seguía siendo un factor de riesgo importante.

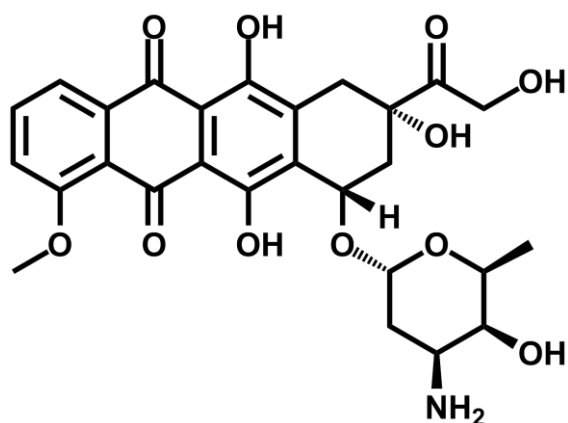


Figura 4. Estructura química de la doxorubicina.

Aunque en décadas posteriores se han sintetizado miles de antraciclinas diferentes en todo el mundo (epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona...), la daunorrubicina y la doxorubicina pueden considerarse como el prototipo de moléculas de esta familia.

A.3.2.2. Mecanismo de acción

Las antraciclinas tienen tres mecanismos de acción diferentes:

- **Inhibición de la síntesis de ADN y ARN**, mediante intercalación entre los pares de bases nitrogenadas de la doble hélice, de tal manera que se impide la replicación de las células tumorales.
- **Inhibición de la enzima topoisomerasa II**, lo cual bloquea las etapas de replicación y transcripción del ADN.
- **Formación de radicales libres de oxígeno**, los cuales dañan las hebras del ADN de células tumorales.

A.3.2.3. Efectos adversos

El más grave y conocido es la cardiotoxicidad, tal y como se ha señalado. Varias posibles causas se han indicado para este efecto, como por ejemplo la formación de radicales libres en el corazón o la acumulación de productos metabólicos antraciclínicos en el tejido cardíaco. La cardiotoxicidad puede desembocar en un ataque al corazón, pero únicamente si el medicamento se ha utilizado de forma continuada durante varios años. Por ello, a modo de prevención, estos medicamentos antitumorales suelen administrarse junto con el dexrazoxano, que actúa de protector cardíaco, reduciendo enormemente el riesgo de cardiotoxicidad sin que la efectividad anticancerígena se vea comprometida. De todas formas, cada cierto tiempo es necesario evaluar si la administración de antraciclinas ha comenzado a afectar al corazón, y suspender el tratamiento en caso necesario.

Otros efectos secundarios menos frecuentes incluyen náuseas, vómitos, completa pérdida del cabello, disminución de glóbulos blancos, orina con coloración rojiza o erupciones cutáneas en las palmas de las manos y las plantas de los pies, con tumefacción, dolor y eritema.

A.3.2.4. Farmacocinética

Las antraciclinas se administran vía intravenosa, penetrando rápidamente en los tejidos y en las células, y uniéndose a las proteínas plasmáticas en un porcentaje elevado. Su vida media se encuentra alrededor de las treinta horas, y su excreción tiene lugar en la orina y las heces.

B. TÉCNICAS LUMINISCENTES

B.1. Introducción histórica y clasificación

La luminiscencia se define como la emisión de luz ultravioleta, visible o infrarroja por parte de especies que previamente se encontraban en un estado electrónicamente excitado producido por la ruptura de enlaces inter- o intramoleculares, por la formación de enlaces intramoleculares o por la transferencia de energía mediante colisión e interacción de radicales, iones, átomos o moléculas.

Los fenómenos luminiscentes se conocen desde tiempos muy antiguos, especialmente los bioluminiscentes, es decir, los debidos a organismos que emiten luz. Por ejemplo, el Libro de las Odas (*Shī Jīng*), la colección de poemas y canciones chinos más antigua que se conoce, incluye descripciones acerca de unos misteriosos gusanos luminiscentes (las luciérnagas). Por su parte, Aristóteles describió en su libro *De Coloribus*, y no sin cierta perplejidad, el hecho de que algunos animales, como peces en descomposición, parecieran producir luz, aun sin poseer fuego de ningún tipo. Incluso leyendas de marineros aseguraban la existencia de misteriosos mares que mágicamente brillaban en la oscuridad hasta donde llega la vista (hoy en día se sabe que este fenómeno se debe a bacterias luminiscentes asociadas a las algas). Marineros a lo largo de los siglos también dejaron constancia de la aparición en los mástiles de sus barcos del fenómeno electroluminiscente que ellos conocían como “Fuego de San Telmo” y que estaban convencidos de que era de mal agüero.

Sin embargo, el término “luminiscencia” data sólo del año 1888. Deriva de la palabra latina *lumen* (luz) y fue propuesto como “Luminiscenz” por el físico e historiador científico alemán Eilhardt Wiedemann para describir todos aquellos fenómenos luminosos que, en oposición a los incandescentes, no están producidos por

un aumento de la temperatura. De hecho, para él la incandescencia era “luz caliente”, mientras que la luminiscencia era “luz fría”.

Los compuestos que originan luminiscencia tienen una naturaleza muy variada:

- **Compuestos orgánicos:** hidrocarburos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenentreno, pireno, etc.), fluoresceína, rodaminas, aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina), etc.
- **Compuestos inorgánicos:** ion uranilo (UO_2^+), iones de lantánidos (como Eu^{3+} o Tb^{3+}), cristales (ZnS, CdS, ZnSe, GaP...), cristales dopados (con Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag...), etc.
- **Compuestos organometálicos:** complejos de rutenio (como $Ru(bipy)_3$), complejos con iones de lantánidos, complejos con agentes quelatantes fluorogénicos (por ejemplo, con la oxina u 8-hidroxiquinolina), etc.

Los fenómenos luminiscentes suelen clasificarse en función de cuál es la fuente que origina el estado electrónicamente excitado, tal y como muestra la tabla B.1. De entre todos los procesos luminiscentes, los más conocidos y aplicados al análisis químico son los fotoluminiscentes (fluorescencia y fosforescencia) y, en menor medida, los quimioluminiscentes. Los tres consisten en la emisión de radiación electromagnética (visible, infrarrojo cercano o ultravioleta) por parte de moléculas o átomos como resultado de transiciones desde estados electrónicamente excitados a un estado de menor energía, que generalmente es el estado fundamental. La fluorescencia y la fosforescencia son similares en cuanto al hecho de que la excitación tiene lugar por absorción de fotones (de ahí que se denominen “procesos fotoluminiscentes”). Sin embargo, en la quimioluminiscencia la excitación se produce mediante una reacción química, es decir, en ausencia de una fuente externa de excitación.

Tabla B.1. Clasificación de los fenómenos luminiscentes.

FUENTE	FENÓMENO	ORIGEN DE LA EMISIÓN
Radiación electromagnética (Absorción / Irradiación)	Fotoluminiscencia: Fosforescencia Fluorescencia	Absorción de la radiación electromagnética (UV, visible o IR-cercano)
	Catodoluminiscencia	Irradiación de partículas β
	Anodoluminiscencia	Irradiación de partículas α
	Radioluminiscencia	Irradiación de partículas γ o rayos X
Térmica	Candoluminiscencia	Sólidos incandescentes
	Termoluminiscencia	Sólidos y cristales en caliente
	Piroluminiscencia	Átomos metálicos en llama
Cambios estructurales en sólidos	Triboluminiscencia	Cristales friccionados o triturados
	Cristaluminiscencia	Cristalización de sólidos
	Lioluminiscencia	Sólidos disueltos
Fenómenos eléctricos	Electroluminiscencia	Descargas eléctricas
	Galvanoluminiscencia	Fenómenos de electrolisis
	Sonoluminiscencia	Exposición a ondas ultrasónicas en disolución
	Piezoluminiscencia	Separación, por fricción, de cargas en la superficie de los sólidos cristalinos
Reacción química	Bioluminiscencia	Reacciones producidas en sistemas biológicos
	Quimioluminiscencia: Electroquimioluminiscencia Oxiquimioluminiscencia	Reacción química de tipo: Procesos electrónicos Reacciones rédox

B.2. Etimología de los fenómenos fotoluminiscentes

Puesto que los procesos fotoluminiscentes son la base de los trabajos recogidos en la presente Memoria, considero esencial incluir aquí una breve introducción acerca de los mismos, prestando especial atención a su etimología.

B.2.1. Fosforescencia

El término “fosforescencia” no deriva del nombre del fósforo, como podría pensarse erróneamente, sino precisamente a la inversa. La palabra “fosforescencia” fue acuñada por alquimistas a principios del siglo XVI (cuando aún no se había descubierto el fósforo) para designar aquellos materiales que brillan en la oscuridad después de haber sido expuestos a la luz durante cierto tiempo. De hecho, fosforescencia significa literalmente “portador de luz” (de las palabras griegas $\phi\omega\varsigma$ = luz y $\phi\omicron\rho\epsilon\upsilon$ = portador).

Esta propiedad se ha observado en innumerables minerales a lo largo de los siglos, siendo el más notorio (aunque no el primero) el *Fósforo de Bolonia*, descubierto por el boloñés Vincenzo Cascariolo, zapatero y alquimista aficionado, en 1602. Un día, durante un paseo por las inmediaciones del Monte Paterno, decidió recoger unas piedras que le resultaron extrañas. Tras haberlas calcinado con carbón, observó que dichas piedras brillaban en la oscuridad tras su exposición a la luz. Se sabe hoy que la emisión de luz se debía al sulfito de bario, compuesto fosforescente formado por la reducción del sulfato de bario presente en las piedras que recogió Cascariolo.

En 1669 el comerciante y alquimista alemán Hennig Brandt aisló un elemento de la orina, al cual también se le llamó fósforo, debido a que se vio que brillaba intensamente en la oscuridad.

B.2.2. Fluorescencia

La etimología del término “fluorescencia” no es tan obvia como la de “fosforescencia”. De hecho, a primera vista parece extraño que en fluorescencia esté incluido el nombre del flúor, un elemento que no es fluorescente en absoluto.

La primera observación registrada de un fenómeno fluorescente se debe al físico español Nicolás Monardes, el cual describió en 1565 el peculiar color azul que tenía una infusión de la madera conocida como *Lignum Nephriticum*. Más tarde, científicos como Boyle o Newton estudiaron esta madera, pero ninguno consiguió entender el fenómeno.

La segunda observación fluorescente importante tuvo lugar en 1833, cuando el sacerdote escocés David Brewster comunicó que un haz de luz blanca que atraviesa un extracto alcohólico de hojas (es decir, la clorofila) parece ser de color rojizo cuando se observa desde un lateral, e indicó la semejanza de este fenómeno con la luz azul procedente de un haz de radiación que atraviesa cristales de fluorita.

Sir George Gabriel Stokes, físico y profesor de matemáticas de Cambridge, retomó las investigaciones acerca de estos fenómenos, y en 1852 publicó su famoso artículo “On the change of refrangibility of light” (“Acerca del cambio de la refrangibilidad de la luz”) [1]. En él demostró con un sencillo experimento que las observaciones anteriores se debían a la emisión de radiación que se producía después de una absorción de luz. Además, observó que la longitud de onda de la luz emitida es siempre mayor que la longitud de onda de la luz de excitación, afirmación que después se conocería como “ley o desplazamiento de Stokes”.

Stokes inicialmente llamó al fenómeno “reflexión dispersiva”, pero más tarde decidió denominarlo “fluorescencia”, término que deriva de fluorspar (fluorita), “de la misma manera que el término opalescencia deriva también del nombre de un mineral” [1]. Por su parte, fluorspar deriva de “fluor” y “spar”. “Spar” es un término inglés con el que en el siglo XVIII se designaban “piedras” más o menos transparentes con cristalización en forma de láminas [2]. Como muchos de ellos funden fácilmente e

incluso pueden ayudar a fundir otros minerales, numerosos mineralogistas y metalúrgicos empleaban la palabra “fluor” para expresar su facilidad para convertirse en fluidos [3] (la palabra deriva de *fluere*, fluir en latín). Muchos “spars” son coloreados debido a la presencia de pequeñas impurezas, las cuales son responsables de sus propiedades fluorescentes (por ejemplo, la fluorita como tal no es fluorescente). Así, las fluorescencias azul y roja se deben a la presencia de iones divalentes y trivalentes de europio, respectivamente. Itrio y disprosio pueden estar presentes también, dando lugar a una fluorescencia de color amarillo [4].

B.3. Mecanismo de los procesos fotoluminiscentes

En los procesos luminiscentes participan principalmente los estados electrónicos. Tanto en los átomos como en las moléculas, los electrones se distribuyen siempre por pares, rellenoando orbitales de energía creciente. Como el principio de exclusión de Pauli establece que en un mismo átomo o molécula no pueden existir dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales, sólo puede haber dos electrones en un mismo orbital y, además, ambos deben tener espines opuestos. Dado que la mayor parte de las moléculas orgánicas poseen un número par de electrones, en el estado fundamental su espín total (S) debe ser igual a cero. Tal estado se denomina singulete o singlete, debido a que en este caso la multiplicidad espectroscópica (que se define como $2S+1$) es uno. Un radical libre, sin embargo, tiene en su estado fundamental un espín total de $\frac{1}{2}$, debido a su electrón desapareado, de tal manera que su multiplicidad espectroscópica es dos, y su estado fundamental se denomina doblete.

El modelo atómico de Bohr establece que en un átomo los electrones orbitan alrededor del núcleo en distintos niveles electrónicos cuantizados. Un electrón puede absorber o emitir energía y, como consecuencia de ello, saltar a niveles de mayor o menor energía, respectivamente, sin pasar por estados intermedios, de tal manera que la diferencia energética entre ambos niveles implicados en la transición se corresponde exactamente con la cantidad de energía absorbida o emitida. Cuando una molécula absorbe energía, el electrón que salta al nivel electrónico más alto puede tener un espín final paralelo o antiparalelo con respecto al electrón que queda en el nivel de menor

energía. Por ello, el estado excitado de una molécula puede ser un singlete (ambos electrones tienen un espín paralelo y la multiplicidad electrónica es uno) o un triplete (ambos electrones son antiparalelos, siendo S igual a uno y la multiplicidad electrónica igual a tres). En la figura B.1 se muestran de forma esquemática todas estas posibilidades.

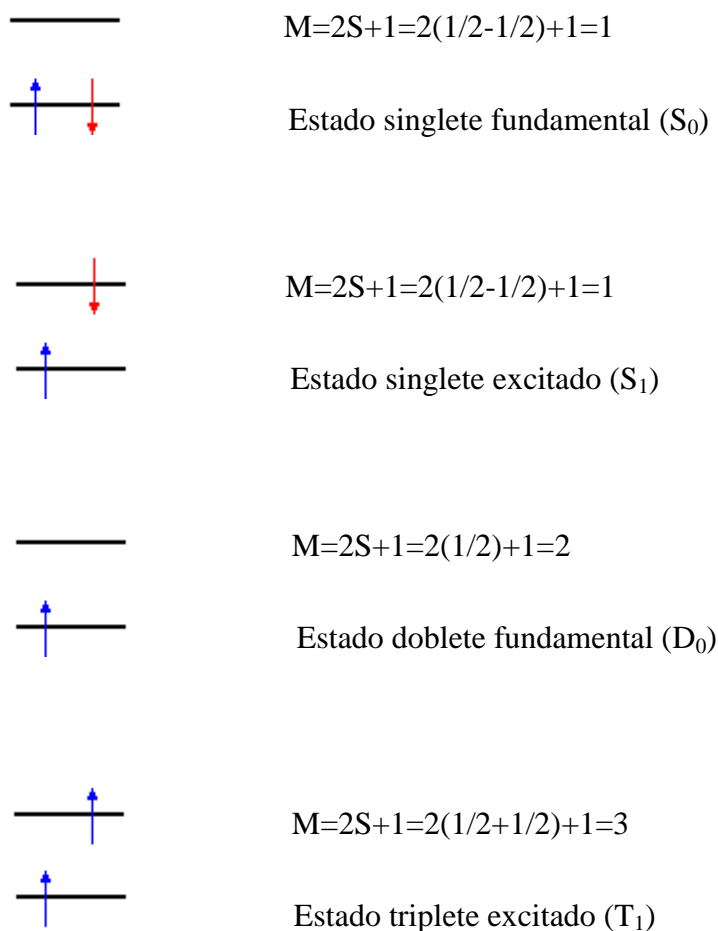


Figura B.1. Representación de los estados singlete, doblete y triplete.

La absorción de energía por parte de una molécula implica, en unos 10^{-15} s, la promoción de un electrón desde el nivel vibracional más bajo del estado electrónico singlete S_0 (estado fundamental) hasta uno de los niveles vibracionales de uno de los estados singletes excitados S_n . Estas transiciones son útiles desde el punto de vista

analítico, puesto que proporcionan información estructural de las moléculas (espectroscopia de absorción UV-visible).

Es importante señalar que no toda la radiación incidente se absorbe, sino que las moléculas presentes en el medio dispersan parte de ella elástica o inelásticamente. La dispersión elástica es la mayoritaria y se conoce como dispersión Rayleigh. Los fotones dispersados tienen en este caso la misma energía y, por lo tanto, la misma longitud de onda que los fotones incidentes, de tal manera que a veces pueden enmascarar la fluorescencia en los casos en los que ésta tiene lugar a longitudes de onda cercanas a la de excitación. Sin embargo, una pequeña fracción de la luz es dispersada inelásticamente, es decir, a frecuencias diferentes a la frecuencia de los fotones incidentes, lo cual es la base de la espectroscopia Raman, en auge actualmente.

Una vez que una molécula se ha excitado hasta un estado S_n debido a la absorción de un fotón, tiende a volver al estado fundamental S_0 mediante la emisión del exceso de energía. Fluorescencia y fosforescencia no son las únicas alternativas, sino que existen otros procesos por los cuales una molécula puede desactivarse. Todos ellos se recogen en el esquema de la figura B.2, conocido como diagrama de Jablonski, en el cual se representan tanto los niveles electrónicos como los vibracionales. El proceso de desactivación de una molécula electrónicamente excitada se detalla a continuación:

- En primer lugar, si la molécula no se encuentra tras la excitación en los estados vibracionales de mínima energía de S_n , se desactiva en de 10^{-13} a 10^{-11} s mediante un proceso conocido como **relajación vibracional**, hasta llegar a dichos niveles. Se trata de un proceso de desactivación no radiante, puesto que la energía no se emite en forma de luz, sino que se pierde como calor, y se debe a colisiones entre las moléculas de las especies excitadas y las moléculas del disolvente.
- A continuación tiene lugar un proceso conocido como **conversión interna**. Es también muy rápido y consiste en el paso de la molécula desde los niveles vibracionales de menor energía de S_2 hasta niveles vibracionales del estado electrónico más bajo S_1 . Es decir, es un cruce entre dos estados de la misma

multiplicidad. Seguidamente, tiene lugar de nuevo la **relajación vibracional** dentro del estado electrónico S_1 . Según la regla de Kasha, sólo a partir de este estado se pueden producir procesos de desactivación a S_0 con emisión de radiación. Dichos procesos son la fluorescencia y la fosforescencia.

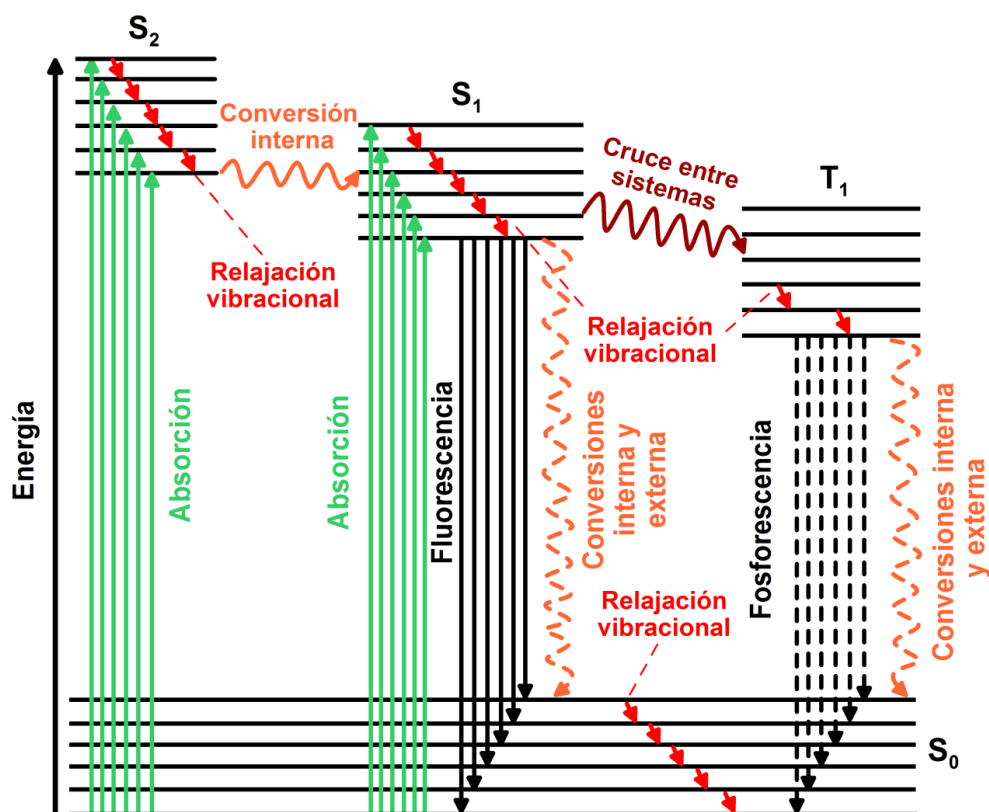


Figura B.2. Diagrama de Jablonski. En él se muestran la excitación de una molécula y las diferentes transiciones radiantes y no radiantes que pueden tener lugar en su posterior desactivación.

- La **fluorescencia** consiste en la desactivación desde el nivel vibracional más bajo de S_1 hasta un nivel vibracional de S_0 (es decir, sin cambio en la multiplicidad de espín), emitiéndose un fotón.
- La **fosforescencia**, sin embargo, es la desactivación desde el nivel vibracional de menor energía del estado triplete T_1 hasta un nivel vibracional de S_0 (con cambio, por tanto, en la multiplicidad del espín), mediante la emisión de un

fotón. Para que la fosforescencia tenga lugar, primero tiene que producirse un **cruce entre sistemas** (proceso no radiante por el cual el electrón salta desde el nivel vibracional de menor energía de S_1 hasta un nivel vibracional de T_1 , salto que lleva asociado un cambio en la multiplicidad del espín) y a continuación la **relajación vibracional** hasta el nivel vibracional de menor energía de T_1 .

Sin embargo, es importante destacar que en el paso de S_1 o T_1 a S_0 siempre existe una competencia entre los procesos de desactivación radiante (fluorescencia y fosforescencia) y los procesos de desactivación no radiante:

- La **conversión interna** es particularmente eficaz cuando dos niveles de energía están lo suficientemente próximos como para que haya solapamiento entre los niveles de energía vibracional. Esta situación es la que presentan los estados singlete excitados S_2 y S_1 . Sin embargo, por mecanismos que no se entienden muy bien, los niveles vibracionales de S_1 pueden solapar con los de S_0 , ocurriendo bajo estas circunstancias una rápida desactivación mediante conversión interna, y no mediante fluorescencia. Esta situación prevalece, por ejemplo, en los compuestos alifáticos, que raramente son fluorescentes, puesto que la conversión interna es en ellos mucho más rápida que la fluorescencia.
- La **conversión externa o atenuación dinámica** consiste en la desactivación del estado electrónico excitado debido a la interacción y la transferencia de energía entre las moléculas excitadas y otras moléculas presentes en el medio (solutos o disolventes). Una evidencia de la conversión externa es el marcado efecto que ejerce el disolvente sobre la fluorescencia, la cual además aumenta generalmente en aquellas condiciones que tienden a reducir el número de colisiones entre las partículas (baja temperatura y elevada viscosidad).
- La **atenuación estática** se produce cuando existe en el medio alguna sustancia capaz de interactuar con la molécula excitada, impidiendo que ésta se desactive emitiendo radiación (generalmente por formación de complejos). El

ejemplo paradigmático es la atenuación de la fluorescencia y, muy especialmente, de la fosforescencia producido por la presencia de oxígeno.

- Por último, al trabajar con metodologías luminiscentes hay que tener en cuenta que puede producirse el **fotoblanqueo**, o descomposición fotoquímica (por luz visible o ultravioleta) de un fluoróforo. Este fenómeno puede complicar la observación de la fluorescencia de las moléculas más sensibles a este efecto, puesto que en algún momento pueden verse destruidas por la exposición a la luz ambiental o a la luz necesaria para excitarlas de modo que produzcan fluorescencia. Para evitar la fotodescomposición se procura mantener siempre en la oscuridad las disoluciones de los fluoróforos y trabajar con longitudes de onda de excitación lo más altas posible.

B.4. Características de los procesos fotoluminiscentes

Los fenómenos fotoluminiscentes muestran ciertas características generales:

- El espectro de emisión de una molécula es independiente de cuál sea la longitud de onda de la radiación que la excitó. Este hecho es una consecuencia de la regla de Kasha, y se debe a que las transiciones de absorción tienen lugar a cualquiera de los niveles vibracionales de un estado electrónico excitado singlete, pero la emisión generalmente se produce desde el nivel vibracional de menor energía de S_1 . Es cierto que en algunas ocasiones se ha observado la emisión desde el estado electrónico S_2 , pero siempre en moléculas no pertenecientes a sistemas biológicos.
- Como consecuencia también de la regla de Kasha, en un proceso fotoluminiscente se libera siempre una cantidad de energía menor o igual a la absorbida, es decir, el espectro de emisión se obtiene siempre a longitudes de onda iguales o mayores a las del espectro de excitación. Como ya se comentó, a este fenómeno se le conoce como desplazamiento de Stokes, y es siempre menor para la fluorescencia que para la fosforescencia, es decir, la fosforescencia

aparece siempre a longitudes de onda más altas que la fluorescencia. Esto se debe a que los niveles de los estados triplete tienen menos energía que sus correspondientes estados singlete (véase el diagrama de Jablonski, figura B.2), tal y como se deduce de la regla de Hund: “un estado con electrones desapareados [es decir, espines paralelos] es más estable [tiene menos energía] que otro con electrones apareados [es decir, espines opuestos o antiparalelos]”.

- Se define el **tiempo de vida** de un proceso luminiscente (τ) como una media del intervalo temporal que transcurre desde la excitación del fluoróforo hasta que el electrón retorna al estado fundamental. El tiempo de vida puede calcularse haciendo uso de la ecuación B.1, donde I es la intensidad medida a un tiempo t e I_0 la intensidad de la fuente de radiación:

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (\text{B.1})$$

El tiempo de vida de un proceso fluorescente es por lo general menor que el de un proceso fosforescente: un tiempo de vida típico de un proceso fluorescente está en torno a 10 ns, mientras que los valores son de milisegundos o incluso de segundos para los procesos fosforescentes. Este hecho se debe a que las transiciones entre singletes están permitidas por la regla de selección del espín de la mecánica cuántica, pero las transiciones entre singletes y tripletes están, en principio, prohibidas. No obstante, puede tener lugar el acoplamiento del espín electrónico con el momento orbital angular debido a que el movimiento orbital del electrón induce un campo magnético que interactúa con el campo magnético del espín. Este efecto es conocido como **acoplamiento espín-orbital** y da lugar a una mezcla mecánico-cuántica de estados de diferentes multiplicidades, de tal forma que los estados tripletes adquieren cierto carácter de singlete, y viceversa. Debido a este proceso, las transiciones entre estados singletes y tripletes dejan de estar prohibidas, lo cual explica que el fenómeno de la fosforescencia, aunque más lentamente que el de la fluorescencia, pueda tener lugar.

- Por otra parte, se define el **rendimiento cuántico** (Φ) de un proceso fotoluminiscente como la relación entre el número de moléculas que emiten

luminiscencia con respecto al número total de moléculas excitadas. Por tanto, Φ puede calcularse en función de la energía liberada en los distintos procesos de desactivación radiante (Γ) y no radiante (K) del estado excitado, tal y como expresa la ecuación B.2:

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + K} \quad (\text{B.2})$$

B.5. Factores estructurales que afectan el rendimiento cuántico de los procesos fotoluminiscentes

La luminiscencia es rara vez consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de longitud de onda inferior a 250 nm, ya que la energía de esta radiación ya es suficiente para producir la desactivación de los estados excitados por disociación. Como consecuencia, la fluorescencia no suele producirse debido a transiciones $\sigma^* \rightarrow \sigma$, sino a transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$ o $\pi^* \rightarrow n$, que son menos energéticas. Empíricamente, se observa que la fluorescencia es más frecuente en aquellos compuestos en los que la absorción de menor energía es del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que en los que es $n \rightarrow \pi^*$, ya que la absorptividad molar, que representa una medida de la probabilidad de una transición, es normalmente mayor en el primer caso. Como un aumento de la absorptividad implica una disminución en el tiempo de vida del estado excitado, lo cual favorece los procesos de desactivación radiante frente a los de desactivación no radiante, se deduce que la eficacia cuántica es mayor para las transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$. Por el contrario, las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, de absorptividad molar menor, implican un tiempo de vida del estado excitado más largo, y son más comunes en procesos fosforescentes.

Como consecuencia de lo anterior, se deduce que el rendimiento cuántico depende en gran medida de la estructura química de la molécula, siendo los fenómenos luminiscentes más favorables en aquellas moléculas con electrones π desapareados, como compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas y alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados. Sin embargo, el número de estos

compuestos es muy bajo en comparación con los sistemas aromáticos, que son los que presentan una fluorescencia más intensa y más útil desde el punto de vista analítico. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, aumentando la eficacia cuántica, en líneas generales, con el número de anillos y su grado de condensación.

La sustitución en los anillos de benceno da lugar a desplazamientos tanto en la longitud de onda de los máximos de absorción de las moléculas como en los picos de fotoluminiscencia. Además, el tipo de sustituyente afecta en gran medida al rendimiento cuántico de fotoluminiscencia, y puede favorecer bien la fluorescencia, bien la fosforescencia. Así, la fluorescencia se ve favorecida por grupos donadores de electrones, como aminas o alcoholes, debido a que el aporte de electrones al sistema bencénico provoca una disminución en la energía de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, por lo que el entrecruzamiento entre sistemas es menos probable. Por el contrario, la presencia de grupos carboxilos, carbonilos, amidas u otros sustituyentes aceptores de electrones favorece la fosforescencia, ya que en estos compuestos la energía de la transición $n \rightarrow \pi^*$ es menor. Por último, la presencia de un halógeno como sustituyente en el sistema bencénico favorece drásticamente la fosforescencia frente a la fluorescencia. Este fenómeno se conoce como **efecto del átomo pesado interno**, y se debe a que los átomos pesados favorecen el acoplamiento espín-orbital en el sistema aromático y, por tanto, el entrecruzamiento entre sistemas.

Puesto que una de las principales causas de desactivación no radiante del estado excitado es la atenuación dinámica producida por el medio, la rigidez estructural es, probablemente, el factor que más condiciona los procesos fotoluminiscentes. El aumento de la rigidez estructural de la molécula disminuye en gran medida el grado de interacción de la molécula con el medio. Además, una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes, favoreciendo este hecho pérdidas de energía mediante conversión interna. En consecuencia, la rigidez estructural favorece los fenómenos de desactivación radiante frente a los fenómenos de desactivación no radiante.

B.6. Factores ambientales que afectan los procesos luminiscentes

- El **disolvente** usado influye en el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia debido a que es capaz de alterar la diferencia de energía entre el estado fundamental y los estados excitados del soluto. De esta forma, al aumentar la **polaridad del disolvente**, suelen desplazarse los máximos de emisión de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ hacia longitudes de onda mayores. Este efecto no es tan acusado en la fosforescencia debido a que el estado triplete excitado no presenta un momento dipolar excesivamente diferente al del estado fundamental. Por tanto, disolventes apróticos favorecen la fosforescencia, ya que producen una estabilización del estado singlete excitado, mientras que en disolventes protonados el efecto es el contrario, y el estado excitado se desestabiliza preferentemente por fluorescencia.

Por otro lado, la disminución de la **viscosidad del disolvente** aumenta la probabilidad de desactivación del estado excitado por conversión externa.

Además, en presencia de **disolventes que contengan átomos pesados** o de solutos con dichos átomos en su estructura, la eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye y la de la fosforescencia aumenta. Este fenómeno se conoce como **efecto del átomo pesado externo** y es análogo al observado cuando se introducen átomos pesados en la estructura de compuestos fotoluminiscentes (la presencia de átomos pesados favorece el cruce entre sistemas, y, por tanto, la fosforescencia). De ahí que cuando se desea exaltar la fosforescencia con frecuencia se incorpora a los disolventes compuestos que contienen átomos pesados.

- La fotoluminiscencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del **pH**, puesto que tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión suelen ser diferentes para una especie ácida y su correspondiente base conjugada. Estos cambios se deben a que una de estas especies puede tener un mayor número de formas resonantes con respecto

a la otra, lo cual tiene una influencia capital en la estabilidad de los estados excitados y en el rendimiento cuántico de la fotoluminiscencia.

- Al aumentar la **temperatura**, aumenta la frecuencia de las colisiones entre moléculas y, por tanto, la probabilidad de desactivación por conversión externa. De este hecho se deduce que la eficacia cuántica de fotoluminiscencia sea mayor a bajas temperaturas.
- La **presencia de oxígeno disuelto** suele disminuir la intensidad de fotoluminiscencia de una disolución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación del analito inducida fotoquímicamente o de la atenuación estática.
- En metodologías de análisis fotoluminiscente a veces es conveniente introducir el analito en medios organizados, como **micelas o ciclodextrinas**, puesto que en estas condiciones las moléculas luminiscentes quedan protegidas de posibles colisiones con otras moléculas del medio. Al disminuir la probabilidad de procesos de desactivación no radiante, se produce un aumento en la eficacia cuántica fotoluminiscente. Esta metodología es especialmente frecuente en análisis fosforescentes, puesto que facilita el acercamiento entre el analito y el átomo pesado que favorece el cruce entre sistemas.
- Por último, el rendimiento cuántico de la fotoluminiscencia disminuye a altas concentraciones del analito, debido a dos procesos conocidos como **autoamortiguación** y autoabsorción o **filtro interno**. El primero es el resultado de colisiones entre moléculas excitadas, tanto más probables cuanto mayor es la concentración de moléculas del analito. La transferencia de energía por vía no radiante en este caso es análoga a la transferencia de energía a las moléculas del disolvente en una conversión externa. Por otra parte, el filtro interno consiste en la reabsorción por parte de las propias moléculas del analito de la radiación emitida por las moléculas de analito de su entorno. Este fenómeno es particularmente importante cuando la longitud de onda de emisión solapa con un pico de absorción.

B.7. Metodologías luminiscentes utilizadas en esta tesis

B.7.1. Introducción

Durante las últimas décadas ha tenido lugar un aumento muy significativo en el uso de técnicas de análisis luminiscente en campos tan diversos como bioquímica, biofísica, química clínica, química medioambiental o medicina. Este auge se explica por las elevadas sensibilidad y selectividad de los métodos luminiscentes frente a la espectroscopia de absorción. No obstante, la medida de la luminiscencia en mezclas de compuestos a veces no resulta sencilla debido a que, aunque cada analito se encuentra caracterizado por sus máximos de excitación y emisión, puede darse un solapamiento entre sus bandas de luminiscencia, que suelen ser relativamente anchas. Adicionalmente, las matrices complejas pueden incluir una gran variedad de compuestos luminiscentes que interfieren en el análisis del fluoróforo de interés.

En los últimos años, el desarrollo de metodologías e instrumentación para el análisis luminiscente ha ido en gran parte encaminado a solventar estos problemas. Un paso muy importante fue la posibilidad de registrar en tiempos razonables los espectros de luminiscencia total de los analitos. Estos espectros tridimensionales contienen mucha más información que los clásicos espectros bidimensionales de excitación y emisión, y resultan más útiles a la hora de abordar la resolución de mezclas complejas. Sin embargo, en el caso de grandes solapamientos e interferencias, el espectro tridimensional *per se* se muestra también insuficiente para la determinación de los analitos de interés con exactitud y precisión, si bien se vio la posibilidad de eliminar dichas interferencias mediante operaciones matemáticas con la matriz de datos de los espectros de luminiscencia total.

Por ello, el desarrollo de métodos y programas informáticos que permitieran manipular matemáticamente los espectros tridimensionales de luminiscencia se mostró para muchos científicos como un campo muy atractivo en la investigación luminiscente. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación desarrolló en 1993 el software denominado FTOTAL [5]. Este programa informático permite un estudio pormenorizado de los

espectros tridimensionales registrados, puesto que se pueden observar en forma de curvas de nivel y de dos proyecciones isométricas diferentes. Pero el aspecto más importante del software es la posibilidad de tratar matemáticamente los espectros de luminiscencia total para conseguir análisis más selectivos, dando lugar a un conjunto de nuevas metodologías para el análisis de mezclas complejas (fluorescencia sincrónica, fluorescencia sincrónica de ángulo variable, fluorescencia sincrónica de ángulo variable no lineal y fluorescencia sincrónica por isopotenciales de la matriz).

Por otra parte, también ha habido investigaciones encaminadas a extender la aplicabilidad de los métodos de análisis fluorescente a aquellas moléculas que no son fluorescentes o que presentan una fluorescencia muy débil en estado nativo. Así, se han desarrollado métodos en los cuales el analito se derivatiza a un compuesto fluorescente y métodos mediante los cuales se añaden a la disolución de medida sustancias destinadas a aumentar la fluorescencia nativa del analito, respectivamente. En el primer caso, destaca la fluorescencia inducida fotoquímicamente, en la cual los analitos no fluorescentes son expuestos a luz ultravioleta antes de su análisis con el fin de transformarlos en derivados fluorescentes. En el segundo caso, la luminiscencia sensibilizada por lantánidos merece una mención especial, no sólo por ser una técnica muy atractiva para la determinación de analitos con débil fluorescencia nativa, sino también porque es la técnica utilizada en la primera parte experimental de la presente Memoria.

B.7.2. Luminiscencia sensibilizada por lantánidos

B.7.2.1. Introducción y mecanismo

Se conoce con el nombre de “lantánidos” a los catorce elementos (con números atómicos del 58 al 71) que siguen al lantano en la tabla periódica. A lo largo de la serie de los lantánidos, el subnivel 4f se va llenando progresivamente de electrones, de tal manera que el primero (el cerio) tiene un electrón y el último (el lutecio) tiene catorce en dicho subnivel energético. Los iones de lantánidos emiten una fluorescencia poco intensa, debido no sólo a que pueden desactivarse fácilmente de forma no radiante por

vibraciones de alta energía de las moléculas del disolvente, sino también a que las bandas de absorción son muy débiles (tanto las absortividades molares como los rendimientos cuánticos de fluorescencia son, en general, bajos para todos ellos).

Sin embargo, es bien conocido que los iones de lantánidos pueden formar complejos fácilmente con ciertos compuestos orgánicos, como las β -dicetonas. Estos complejos se estudiaron en profundidad, y se vio que eran capaces de emitir una intensa luminiscencia, lo cual se utilizó para la determinación con elevada sensibilidad de iones lantánidos. El aumento en la intensidad de la luminiscencia de los iones lantánidos cuando se hallan complejados con estos ligandos orgánicos se debe a un proceso conocido como **transferencia de energía intramolecular**. Un esquema del mecanismo de excitación-emisión se muestra en la figura B.3.

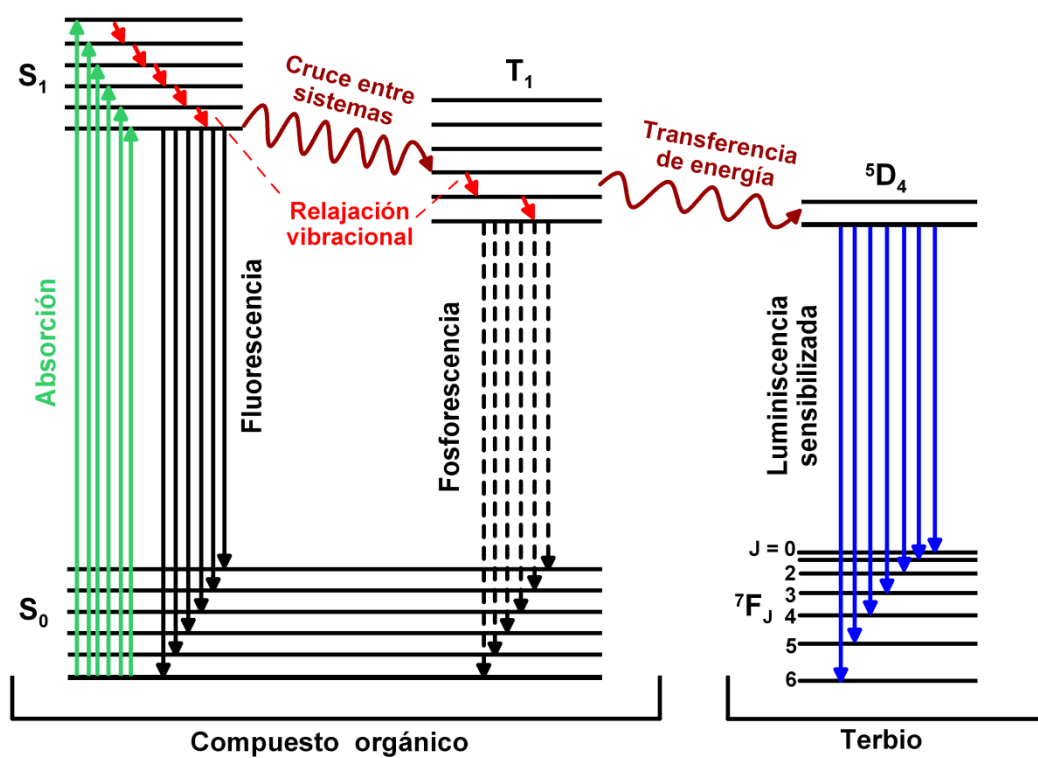


Figura B.3. Diagrama de Jablonski y mecanismo de transferencia de energía entre un donador orgánico y un ion terbio.

La absorción tiene lugar en los niveles de energía del compuesto orgánico. A continuación, se produce un cruce entre sistemas, de tal forma que la energía pasa de estados singletes excitados a estados tripletes excitados, siempre dentro de los niveles energéticos del ligando orgánico. Por último, la energía se transfiere intramolecularmente desde los estados triplete del compuesto orgánico hasta los niveles 4f del ion lantánido, el cual se desactiva mediante luminiscencia. Es decir, el método implica la utilización de las bandas anchas de absorción del ligando orgánico en sustitución de las bandas de absorción débiles y estrechas de los iones lantánidos (de manera que la baja absorptividad de los iones lantánidos ya no es un problema) y la emisión de la energía absorbida en forma de luminiscencia, lo cual prácticamente no ocurre en ausencia del ion lantánido.

En estos complejos, la intensidad de fluorescencia depende de dos factores:

- En primer lugar, la eficiencia en la transferencia de energía depende de la proximidad entre el nivel triplete del compuesto orgánico y el nivel de resonancia del ion lantánido, de tal manera que la energía del primero debe ser parecida, aunque mayor, que la del segundo.
- En segundo lugar, la probabilidad de la desactivación no radiante del nivel resonante del ion lantánido debe ser más baja que la probabilidad de que ocurra la transición radiante.

En otras ocasiones, la transferencia de energía tiene lugar de forma intermolecular, es decir, sin que el compuesto orgánico se halle formando complejo alguno con el ion lantánido. Investigaciones con aldehídos y cetonas aromáticos excitados concluyen que en este caso también existe un cruce entre sistemas entre los niveles singlete y triplete excitado del compuesto orgánico. En ausencia de un compuesto aceptor, el estado triplete se desactiva sin emitir fosforescencia, ya que la velocidad de los procesos no radiantes es generalmente mucho más alta que la de los procesos radiantes. Sin embargo, en presencia de un aceptor adecuado, como un ion lantánido, el proceso de transferencia de energía ocurre más rápidamente que la desactivación no radiante del compuesto, lo cual tiene como consecuencia final la

emisión de luminiscencia por parte del lantánido. La transferencia de energía intermolecular ocurre debido a colisiones entre las moléculas dadoras yceptoras.

En la práctica, sólo Sm^{3+} , Dy^{3+} , Tb^{3+} y Eu^{3+} se usan como aceptores de energía ya que son los que presentan una mayor fluorescencia. De entre estos cuatro, Tb^{3+} y Eu^{3+} son los más utilizados debido a que sus tiempos de vida son más largos y, además, su luminiscencia no se halla atenuada por la gran mayoría de las moléculas orgánicas utilizadas como analitos.

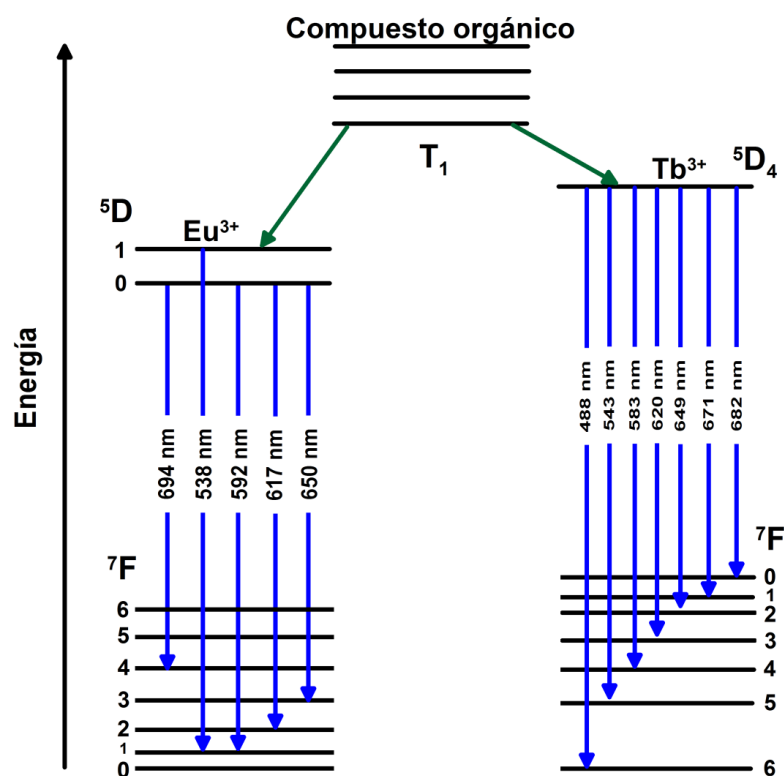


Figura B.4. Distintos picos luminiscentes observados como consecuencia de la transferencia de energía desde un donador orgánico a un ion de europio (izquierda) o de terbio (derecha). Se indica la longitud de onda a la que ocurre cada transición.

Los espectros de fluorescencia de Tb^{3+} y Eu^{3+} están formados por varias bandas estrechas debido a diferentes transiciones electrónicas en las que participan sus orbitales 4f. El número y la intensidad de cada uno de estos picos están enormemente condicionados por el estado de coordinación del ion y, por tanto, por la naturaleza del medio. En complejos entre compuestos orgánicos e iones de lantánidos, la intensidad de dichos picos de luminiscencia es directamente proporcional a la concentración del compuesto orgánico (el analito) en la disolución y, por tanto, la luminiscencia sensibilizada por lantánidos resulta una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo de moléculas que presentan una baja fluorescencia nativa.

B.7.2.2. Factores que afectan a la luminiscencia sensibilizada

A la hora de desarrollar métodos de análisis basados en esta técnica, hay que tener en cuenta varios factores que influyen en la transferencia de energía y, por tanto, en la intensidad de la luminiscencia sensibilizada:

- La sensibilidad óptima en la emisión luminiscente se encuentra a una determinada **concentración de átomos de lantánido**. La proporción con respecto a la concentración del analito varía entre 1 y 250, dependiendo de cuál sea la naturaleza de este último. Además, para el mismo compuesto, también puede variar dependiendo de si en el medio hay micelas presentes.
- El **contraanión del ion lantánido** también puede influir enormemente en la emisión luminiscente por parte de este último. Así, por ejemplo, si la transferencia de energía es intermolecular, la sensibilidad es mucho mayor si se utilizan cloruros que si se utilizan nitratos. Esto puede deberse a la mayor tendencia del nitrato a formar una esfera interna de coordinación, dando lugar a una menor frecuencia de colisiones, lo cual dificulta la transferencia de energía intermolecular. En cualquier caso, los cloruros de lantánido se usan mucho más debido a que son solubles en agua y compatibles con la mayoría de los disolventes orgánicos, como el acetonitrilo o el metanol.

- Los lantánidos forman **quelatos** estables con ligandos que contienen grupos donadores de electrones negativamente cargados, tales como el ácido dipicolínico o las β -dicetonas, por lo que son estas especies las que se pueden determinar mediante fluorescencia sensibilizada por lantánidos.
- La transferencia de energía del ligando orgánico al lantánido y la posterior luminiscencia de éste siempre compiten con mecanismos de desactivación no radiante. Por ello, en la luminiscencia sensibilizada por lantánidos suelen utilizarse **soluciones micelares**, con el fin de proteger al quelato de otros aceptores de energía, minimizando, por tanto, los procesos de desactivación no radiante. Los surfactantes utilizados pueden ser tanto no iónicos (Tritón X-100), como iónicos, bien aniónicos (dodecilsulfato sódico o SDS) o catiónicos (cloruro o bromuro de cetiltrimetilamonio, CTACl o CTABr).
- La eficacia cuántica aumenta enormemente cuando los quelatos lantánido-analito se hallan formando complejos ternarios con **agentes sinérgicos**, ya que estos actúan eliminando las moléculas de disolvente de la esfera de coordinación del ion lantánido, las cuales producen la atenuación de la luminiscencia. Por tanto, los ligandos sinérgicos favorecen la emisión radiante de los lantánidos frente a procesos de desactivación no radiante. Ejemplos de este tipo de compuestos son: el ácido etilendiamintetraacético (EDTA), el ácido nitrilotriacético (ANT), el ácido aminoacético (AAA), el óxido de trioctilfosfina (TOPO), la difenilguanidina (DPG), la tenoiltrifluoroacetona (TTA), la fenantrolina, el ácido trimésico (TMA), la benzoilacetona o la α - α -bipiridina.
- La luminiscencia de los iones lantánidos está favorecida a **pH** neutro o ligeramente alcalino, ya que es a estos pH cuando los ligandos orgánicos donadores de electrones se encuentran ionizados, lo cual facilita la unión de estos al lantánido dando lugar a quelatos estables. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a pH muy alcalinos se produce la precipitación de los iones lantánido en forma de hidróxido, lo cual produce una brusca disminución de la luminiscencia.

- El aumento de la **temperatura** provoca la disminución de la luminiscencia si el proceso de transferencia de energía es intramolecular, debido a que a altas temperaturas se favorecen los procesos de desactivación radiante. Sin embargo, el efecto es el inverso si la transferencia de energía es intermolecular, ya que se favorecen las colisiones entre las moléculas del analito y los iones del lantánido.
- La transferencia de energía intermolecular es solamente posible si la disolución se ha **desoxigenado** a conciencia previamente, ya que de lo contrario predomina la desactivación del estado excitado por vías no radiantes. Sin embargo, si la transferencia de energía es intramolecular, la presencia de oxígeno en la disolución no tiene ninguna influencia en la emisión luminiscente.

B.7.2.3. Antecedentes bibliográficos

Desde hace varias décadas existe un interés considerable en el desarrollo de métodos de análisis que impliquen luminiscencia sensibilizada por lantánidos, no sólo debido a que posibilitan la determinación luminiscente de analitos con baja fluorescencia nativa, sino también a otras ventajas inherentes a la técnica, como grandes saltos de Stokes, bandas de emisión estrechas y largos tiempos de vida.

El fenómeno de transferencia de energía fue observado por primera vez por Weissman en 1942 [6] en complejos orgánicos con europio. Veinte años más tarde, Crosby y Whan [7, 8] mostraron que el fenómeno tiene lugar desde el nivel triplete de menor energía del ligando orgánico a los niveles 4f del ion lantánido. En décadas posteriores, el fenómeno se aprovechó extensamente para la determinación altamente sensible de los propios iones de lantánidos [9-16].

Fue en 1982 cuando Hirschy y col. [17] demostraron que el fenómeno de transferencia de energía se puede utilizar no sólo para determinar los iones de lantánidos, sino también los ligandos orgánicos. Para ilustrar su descubrimiento, estos autores escogieron como analitos compuestos de la familia de las tetraciclinas, debido a la facilidad con que éstas forman quelatos con iones metálicos [18]. Obtuvieron límites

de detección de 2,4 y 7,0 nmol L⁻¹ para tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina, respectivamente. Desde entonces, varios han sido los métodos desarrollados para determinar diversas tetraciclinas mediante luminiscencia sensibilizada con europio, utilizando tanto surfactantes como sensibilizadores con el fin de aumentar aún más la luminiscencia [19-23]. Gracias a las ventajas de la calibración multivariante, en el año 2008 Ibáñez [24] determinó simultáneamente tetraciclina y oxitetraciclina en suero bovino sin necesidad de separación previa. Los métodos más recientes para el análisis de tetraciclina complejada con europio han incorporado excitación con LEDs [25] y complejación en fibras de silicato mediada por microondas [26].

También se han publicado métodos de determinación luminiscente basados en la formación de complejos entre europio y los fármacos atenolol [27] y piroxicam [28].

El grupo de investigación de Panadero, Gómez Hens y Pérez Bendito aplicó extensamente la luminiscencia sensibilizada por lantánidos a métodos cinéticos en la modalidad de flujo detenido. En dichos métodos, las disoluciones de lantánido y analito se encuentran inicialmente separadas en jeringas, y la medida de la luminiscencia comienza en cuanto ambos se inyectan y se mezclan en la celda de detección. De esta forma, hicieron uso de Eu³⁺ para determinar tetraciclina en suero [29], tetraciclina y doxiciclina en suero [30], pindona en cebos de pesca [31] y ácido carmínico en refrescos de naranja [32]. Esta última determinación es indirecta, y se basa en el efecto inhibitorio que tiene el ácido carmínico sobre la luminiscencia del complejo Eu³⁺-difacinona. También utilizaron sensibilización con Tb³⁺ para determinar ácido nalidíxico y norfloxacino en suero [33], ácido salicílico y diflunisal en suero [34], bromadiolona en agua de riego [35], ácido p-aminobenzoico en medicamentos [36] y ácido p-aminobenzoico y sacarina en refrescos [37]. Ortega Algar y col. también determinaron ácido p-aminobenzoico mediante luminiscencia sensibilizada por Tb³⁺ e inyección en flujo [38].

Ioannou y col. llevaron a cabo en 1998 el estudio de complejos entre derivados antranílicos y Tb³⁺ [39]. Determinaron furosemida, ácido mefenámico y ácido tolfenámico en suero, con límites de detección del orden de nmol L⁻¹. En 2003, Arnaud y Georges [40] estudiaron furosemida y ácidos flufenámico, mefenámico y tolfenámico,

y disminuyeron los límites de detección en un factor de diez gracias al uso de surfactantes. Estos últimos autores también habían determinado previamente los ácido salicílico, p-aminosalicílico y 5-fluorosalicílico por el mismo método [41].

El grupo de investigación de Rabouan hizo uso de la luminiscencia sensibilizada por terbio como método de detección tras HPLC para determinar progesterona [42] y oligopéptidos en leche [43]. Fotopolou y col. [44] utilizaron también este método para determinar norepinefrina, epinefrina y dopamina; y Andreu Navarro y col. [45] lo aplicaron a la determinación de flavonoides en zumo de naranja. Otros muchos métodos basados en separaciones cromatográficas con detección luminiscente sensibilizada por lantánidos pueden encontrarse en los artículos de revisión escritos por Rieutord y col. [46, 47].

Shaghghi y col. [48] determinaron en 2008 el contenido total en fenoles de té y zumos de tomate y manzana mediante luminiscencia sensibilizada por terbio.

Por su parte, Casas Hernández y col. desarrollaron en 2003 [49] un método para determinar ésteres de ftalatos basado en la hidrólisis de estos seguida de la detección luminiscente resuelta en el tiempo de quelatos ftalato-terbio.

En 2009, Ruíz Medina y col. [50] propusieron el primer método espectroscópico para determinar cromolina, un principio activo usado en el tratamiento de alergias. Utilizó detección luminiscente sensibilizada con terbio y se aplicó con éxito a muestras de orina.

Durante la última década del siglo XX y la primera del siglo XXI se publicaron numerosos trabajos para determinar quinolonas mediante luminiscencia sensibilizada por lantánidos, tal y como muestra la tabla B.2.

Tabla B.2. Determinaciones de quinolonas mediante luminiscencia sensibilizada por lantánidos.

Ref.	Analitos	Lantánido	Matriz	Método	Año
[51]	Ciprofloxacino	Tb ³⁺	-	Luminiscencia micelar	1994
[52]	Pefloxacino, ciprofloxacino y norfloxacino	Tb ³⁺	Suero	Fluorimetría micelar	1997
[53]	Ciprofloxacino y enrofloxacin	Tb ³⁺	Pollo, trucha	Fosforescencia micelar	1998
[54]	Levofloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Luminiscencia micelar	2000
[55]	Grepafloxacino	Tb ³⁺	Orina y suero	Luminiscencia micelar	2001
[56]	Rufloxacino	Eu ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría	2001
[57]	Rufloxacino	Eu ³⁺	Suero y orina	Quimioluminiscencia en flujo	2001
[58]	Ácido pipemídico	Tb ³⁺	Orina	Quimioluminiscencia en flujo	2002
[59]	Norfloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Quimioluminiscencia en flujo	2002
[60]	Tosufloxacino	Tb ³⁺	Medicinas	Fluorimetría	2002
[61]	Lomefloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Quimioluminiscencia en flujo	2002
[62]	Ciprofloxacino	Eu ³⁺	Medicinas	Fosforescencia en flujo	2002
[63]	Ciprofloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Quimioluminiscencia en flujo	2003
[64]	Grepafloxacino	Tb ³⁺	Medicinas y orina	Quimioluminiscencia en flujo	2003
[65]	Garenoxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría micelar	2004
[66]	Mesilato de pazufloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría	2004
[67]	Ácido pipemídico	Tb ³⁺	Fluidos biológicos	Luminiscencia en flujo	2005
[68]	Mesilato de pazufloxacino	Eu ³⁺	Suero y orina	Quimioluminiscencia en flujo	2005
[69]	Norfloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Luminiscencia en flujo	2005
[70]	Tosufloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, suero	Electroquimioluminiscencia	2005

[71]	Ciprofloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Quimioluminiscencia en flujo	2005
[72]	Mesilato de pazufloxacino	Eu ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría micelar	2006
[73]	Ulifloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría de dispersión	2007
[74]	Prulifloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Fluorimetría micelar	2008
[75]	Orbifloxacino	Tb ³⁺	Medicinas y orina animales	Luminiscencia	2008
[76]	Mesilato de pazufloxacino	Tb ³⁺	Medicinas y fluidos biológicos	Quimioluminiscencia en flujo	2009
[77]	Prulifloxacino y ulifloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Quimioluminiscencia en flujo	2009
[78]	Ciprofloxacino, danofloxacino y norfloxacino	Tb ³⁺	Suero	Análisis multivariante de matrices de excitación-decaimiento	2009
[79]	Sarafloxacino	Tb ³⁺	Medicinas	Fluorimetría	2009
[80]	Ciprofloxacino	Tb ³⁺	Suero y orina	Quimiometría para análisis de matrices de excitación-decaimiento y quimioluminiscencia	2009
[81]	Prulifloxacino	Tb ³⁺	Medicinas, orina, suero	Quimioluminiscencia en flujo	2010

Asimismo, se llevó a cabo la determinación de Eu³⁺ en muestras de tierras raras basada en su complejo con esparfloxacino [82], y las determinaciones indirectas de vitamina M (ácido fólico) en medicamentos [83] y de celastrol [84] aprovechando la disminución que estos compuestos producen en la luminiscencia de los complejos de ciprofloxacino con Eu³⁺ y Tb³⁺, respectivamente.

Por último, la luminiscencia sensibilizada por terbio se ha utilizado también extensamente en inmunoensayo y en la determinación de nucleótidos, ácidos nucleicos o esporas bacterianas, sustituyendo a los tradicionales y peligrosos marcadores radioactivos. A este respecto, puede consultarse el completísimo artículo de revisión

que publicaron Gómez Hens y Aguilar Caballos en el año 2002 [85] acerca de la luminiscencia sensibilizada por terbio.

B.7.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Los métodos fluorimétricos clásicos, basados en la medida de la intensidad (fluorescencia en estado estacionario), son generalmente más ventajosos que los métodos espectrofotométricos, puesto que los primeros presentan una mayor sensibilidad. Sin embargo, la medida de la intensidad de fluorescencia tiene la desventaja de no ser una magnitud auto-referenciada. En efecto, mientras que en las medidas espectrofotométricas sí existe auto-referencia, puesto que la transmitancia medida (así como la absorbancia) es la relación entre la intensidad de dos haces de luz, la intensidad de fluorescencia depende de múltiples parámetros, tal y como puede deducirse de la ley de Parker (ecuación B.3):

$$I_F = I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l \cdot \Phi \cdot k \quad (\text{B.3})$$

donde I_F es la intensidad de fluorescencia, I_0 la intensidad de la fuente de radiación, ε el coeficiente de absortividad molar, c la concentración del fluoróforo, l el paso óptico o anchura de la cubeta, Φ el rendimiento cuántico de fluorescencia y k un factor geométrico que incluye, por ejemplo, la sensibilidad del detector. Particularmente I_0 y k son muy susceptibles de sufrir variaciones, lo cual puede conducir a errores en las medidas de la fluorescencia.

Sin embargo, la mayoría de dichas variaciones no afectan, en general, el tiempo de vida de un fluoróforo. Gracias a este hecho, actualmente se utilizan con mucha frecuencia las técnicas basadas en la medida del tiempo de vida de fluorescencia (fluorescencia resuelta en el tiempo), especialmente para el estudio de macromoléculas biológicas, como aminoácidos, proteínas o ADN, que son fluorescentes.

En comparación con las tradicionales medidas de la intensidad fluorescente, la fluorescencia resuelta en el tiempo se muestra como una técnica más selectiva (ya que cada molécula tiene un tiempo de vida específico) y, además, proporciona mucha más información molecular, puesto que muestras compuestas por varios fluoróforos suelen mostrar decaimientos de fluorescencia multiexponenciales. Se verá a continuación con un ejemplo: considérese una proteína con dos residuos de triptófano. La fluorescencia clásica es incapaz de distinguir entre ambos debido al enorme solapamiento existente entre sus respectivos espectros de excitación y emisión. Sin embargo, la fluorescencia resuelta en el tiempo podría revelar dos tiempos de vida diferentes, lo cual podría usarse para resolver los espectros de emisión y calcular las intensidades fluorescentes relativas de cada uno de los triptófanos. Además, se concluiría que ambos residuos deben tener un entorno diferente, y podría estudiarse cómo afecta a cada uno de ellos las interacciones de la proteína con su sustrato o con cualquier otra macromolécula del medio. Podrían listarse muchos otros casos en los cuales la fluorescencia resuelta en el tiempo proporciona mucha más información que la intensidad de fluorescencia en estado estacionario.

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo pueden llevarse a cabo de dos formas, lo cual ha dado origen a dos tipos de métodos ampliamente utilizados en la actualidad: los basados en medidas en el campo de frecuencias y los basados en medidas en el campo de tiempos.

- Los métodos basados en medidas del tiempo de vida en el campo de frecuencias se conocen también como **métodos de modulación de fase**, puesto que la excitación de la muestra tiene lugar debido a la incidencia sobre ella de un haz de luz de amplitud modulada, generalmente en forma de función sinusoidal. Esta excitación de amplitud modulada no debe confundirse con la componente eléctrica de una onda electromagnética. La intensidad de la luz incidente se varía a alta frecuencia, similar a la asociada al tiempo de vida del analito. Cuando se excita de esta forma una muestra fluorescente, se fuerza la emisión a la misma frecuencia modulada. Sin embargo, debido al tiempo de vida del analito, la onda de emisión sufre un pequeño desfase (“phase shift”) con respecto a la onda de excitación, tal y como muestra la figura B.5. Este hecho puede usarse para

determinar el tiempo de vida de la muestra, de acuerdo con la ecuación B.4, válida para decaimientos monoexponenciales:

$$\tau = \frac{tg\Phi}{2\pi f_{mod}} \quad (B.4)$$

donde τ es el tiempo de vida del analito, Φ es el desfase entre la excitación y la emisión y f_{mod} es la frecuencia del haz de excitación modulado. En el caso de que la muestra de interés muestre más de un decaimiento fluorescente, el valor del tiempo de vida calculado con esta expresión es solamente aparente. Para calcular en estas muestras cada uno de los tiempos de vida de forma individual, es necesario medir el desfase en el mayor rango posible de frecuencias de modulación, estando la central próxima a la frecuencia asociada al tiempo de vida medio de la muestra a analizar.

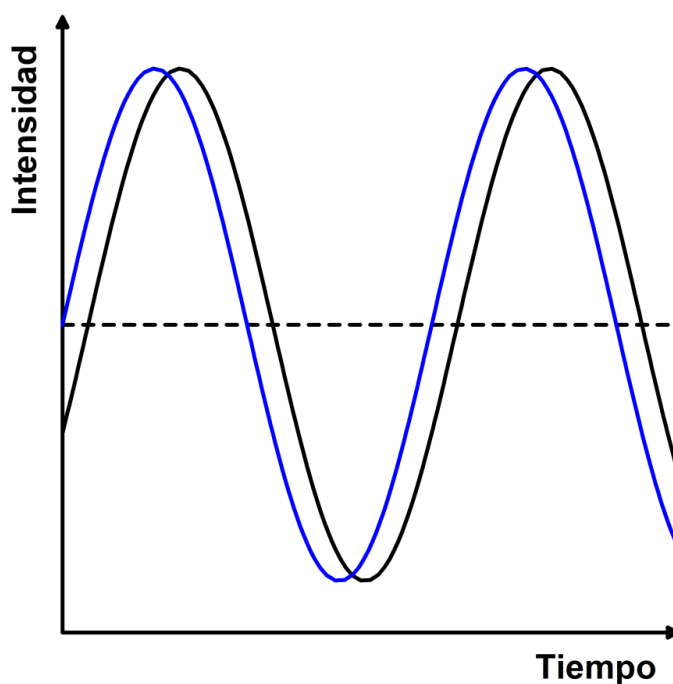


Figura B.5. Fluorescencia (en negro) en respuesta a la radiación de excitación de intensidad modulada (en azul). Obsérvese el desfase entre ambas ondas, debido al tiempo de vida del estado excitado.

- La medida del tiempo de vida en el campo de tiempos se conoce también como **fluorometría de pulso**, ya que la muestra se excita en este caso mediante un pulso de luz. La anchura de dicho pulso debe ser lo más pequeña posible, preferentemente mucho más que el tiempo de vida de la muestra. Se mide la intensidad dependiente del tiempo, $I(t)$, que sigue al pulso de excitación, y el tiempo de vida se calcula bien a partir de una gráfica del $\log I(t)$ frente al tiempo t , bien a partir del tiempo al cual la intensidad es $1/e$ del valor a $t = 0$, según la ecuación B.5 (la cual puede deducirse de la ecuación B.1):

$$I(t) = I_0 \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (\text{B.5})$$

donde I_0 es la intensidad a tiempo cero. Al igual que se comentó en los métodos de modulación de fase, la ecuación B.5 es válida sólo para decaimientos monoexponenciales. Si el decaimiento es multiexponencial, el tiempo de vida calculado es sólo aparente.

Casi todas las medidas en fluorometría de pulso se llevan a cabo hoy en día mediante la técnica llamada “Time-Correlated Single-Photon Counting” (TCSPC). En este caso, el experimento empieza con un pulso de luz procedente de la fuente de radiación (una lámpara pulsada o un láser), el cual excita la muestra e inicia la medida del tiempo. Los fotones emitidos por la muestra llegan al detector, se cuentan y se relacionan temporalmente con respecto al pulso de excitación. Este proceso de excitación-emisión se repite múltiples veces, obteniéndose como resultado un histograma que refleja la probabilidad de que un cierto número de fotones llegue al detector a un determinado tiempo. A partir de este histograma puede trazarse la curva de decaimiento fluorescente que permite calcular el tiempo de vida de la muestra (figura B.6).

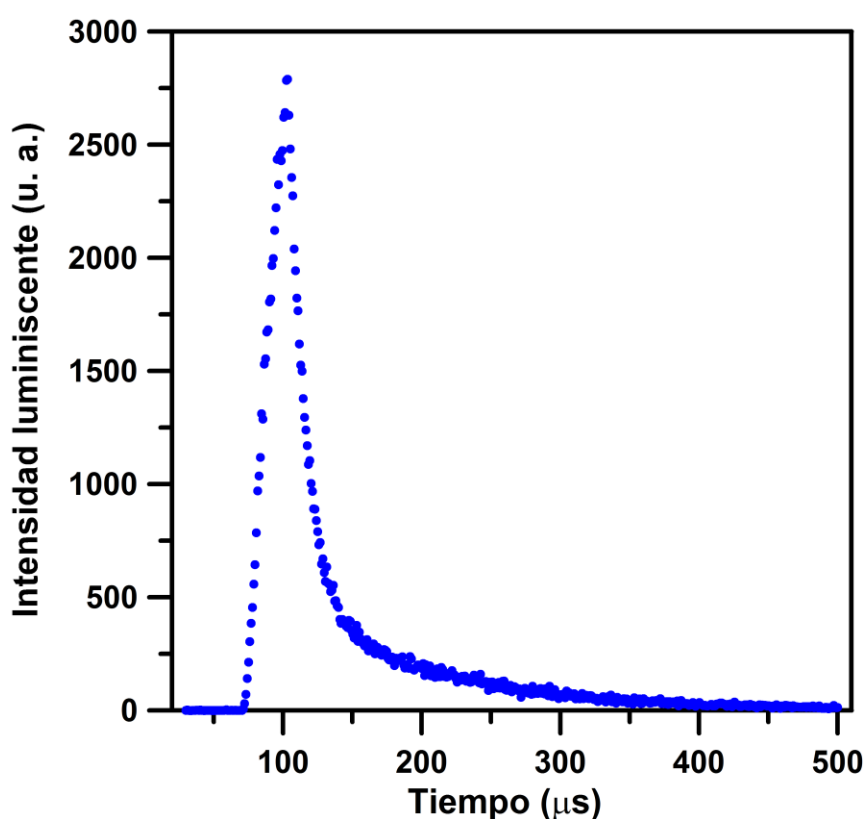


Figura B.6. Puntos experimentales de un decaimiento luminiscente obtenido mediante Time-Correlated Single-Photon Counting.

Por otra parte, la fluorescencia resuelta en el tiempo se muestra también como una alternativa muy atractiva para resolver mezclas de analitos cuyos espectros de excitación y emisión fluorescente presentan un intenso solapamiento, pero sus tiempos de vida son diferentes. Si la diferencia entre los tiempos de vida es muy grande, puede determinarse el analito de mayor tiempo de vida en presencia del otro analito. Para ello, únicamente es necesario realizar la medición a un tiempo al cual la fluorescencia del primer analito ya haya decaído completamente.

Sin embargo, en muchas ocasiones la diferencia entre los tiempos de vida no es muy grande. Debido a ello, la intensidad de fluorescencia del analito de tiempo de vida más largo es muy poco intensa en el punto temporal al cual ya ha decaído completamente el analito de tiempo de vida más corto. El análisis multivariante, extensamente aplicado a métodos basados en fluorescencia en el estado estacionario, se

muestra aquí también como una metodología muy útil para la resolución de este tipo de mezclas complejas, ya que permite estudiar y analizar matemáticamente las curvas de decaimiento fluorescente completas de cada una de las muestras del analito. Ejemplos ilustrativos pueden encontrarse en el siguiente apartado.

B.7.3.1. Antecedentes bibliográficos

El desarrollo y uso de nuevas técnicas instrumentales, especialmente potentes láseres pulsados como fuente de excitación [86, 87], ha convertido la fluorescencia resuelta en el tiempo en una importantísima técnica de análisis [88-90].

La principal aplicación hasta la fecha ha sido a sistemas biológicos [91] para la determinación de, por ejemplo, aminas [92], aminoácidos y aminas primarias en agua de mar [93], enzimas [94-96], proteínas en suero sanguíneo [97], mononucleótidos [98] y oligonucleótidos [99], así como ensayos con ADN [100-103] o ARN [104]. Determinaciones fluorescentes resueltas en el tiempo son ya muy habituales en métodos bioquímicos tan usados como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [105-109] y, especialmente, el inmunoensayo [110-113].

La fluorescencia resuelta en el tiempo es también una técnica muy útil para determinar lantánidos, actínidos y metales pesados en muestras biológicas, nucleares y medioambientales [114-120], como por ejemplo samario [121], europio [16, 122], terbio [123, 124], torio [125], uranio [126-128], americio [129], o metales pesados en aerosoles [130]. Análogamente se ha llevado a cabo especiación de elementos (curio [131], uranio [132-138], europio [139-141]) y determinaciones simultáneas de disprosio, europio, samario y terbio [142, 143], disprosio y terbio [144], aluminio y galio o indio [145], y europio y samario [146, 147].

Además, la aplicabilidad de la técnica se ha extendido a la determinación de analitos capaces de formar complejos con lantánido, actínidos y metales pesados, en muestras bioquímicas, medioambientales y clínicas [148]. De esta forma se han investigado quelatos de uranio [149], complejos de terbio y disprosio [150], coloides de

plomo [151] o fluoroquinolonas complejadas con terbio [51, 152, 153]. Sin embargo, la mayor parte de los complejos formados son con europio [154-156], por ejemplo con el surfactante TAC8 [157], el ácido húmico y el carbonato [158], el ácido fúlvico [159], el ácido pipemídico [160], el lomefloxacino [161], la furosemida [162], las tetraciclinas [19, 24], las benzodiazepinas [163]... Esta técnica se ha acoplado asimismo a inmunoensayos [164-168] y como sistema de detección tras HPLC [51, 152, 169-172] y electroforesis capilar [173, 174].

Otros campos donde la fluorescencia resuelta en el tiempo ha dado lugar a un gran número de publicaciones son la caracterización del crudo de petróleo [175, 176] y de sus contaminantes en aguas y suelos [177], la determinación de fenoles [178] y la de hidrocarburos aromáticos policíclicos [179-183] en aerosoles [184-186], agua [186-195] y aire [196].

En el desarrollo de sensores químicos también se han aprovechado las ventajas que proporciona la fluorescencia resuelta en el tiempo [197-203]. En bibliografía se encuentran descritos sensores para pH [204-206], serotonina [207], sodio [208], litio [209], cobre en agua [210, 211], oxígeno [212], peróxido de hidrógeno [213, 214], ácidos grasos [215], etc.; así como puntos cuánticos (“quantum dots”) para determinar 5-fluorouracilo [216], mercurio [217, 218], o cobre en té y agua [219].

Otras aplicaciones de la fluorescencia resuelta en el tiempo incluyen, por ejemplo, el estudio de fluidos supercríticos [220], y la determinación de fluoresceína en presencia de bilirrubina [221], de las proteínas presentes en diferentes muestras de pintura [222, 223], y del ácido salicílico y la salicilamida simultáneamente en suero sanguíneo y orina humanos [224].

B.7.3.2. “Dual-Lifetime Referencing”

Se indicó ya anteriormente que la medida del tiempo de vida de fluorescencia tiene numerosas ventajas frente a la medida de la intensidad. Entre estas ventajas se encuentra el hecho de no estar afectada por factores como la intensidad de la fuente de

excitación o la atenuación estática. No obstante, otros efectos, como la atenuación dinámica, la temperatura o variaciones en la sensibilidad del detector pueden tener un impacto enorme sobre la medida del decaimiento de fluorescencia. De ahí que en el año 2000 Huber y col. [225] desarrollaran un método de patrón interno que permite auto-referenciar el tiempo de vida de un analito. Este método se conoce como “Dual-Lifetime Referencing” (DLR) y es capaz de evitar errores en las medidas fluorescentes debidos a efectos como la deriva de la corriente eléctrica o la turbidez de la muestra, lo cual implica una mejora muy importante de los métodos de fluorescencia resuelta en el tiempo.

El fundamento del método DLR es en principio muy sencillo, ya que en la práctica sólo implica el análisis conjunto mediante fluorescencia resuelta en el tiempo de un indicador fluorescente y de un luminóforo de referencia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ambos compuestos deben cumplir los siguientes requisitos:

- El tiempo de vida del luminóforo de referencia debe ser al menos cien veces el del indicador fluorescente. Así, normalmente el primero tiene un tiempo de vida de microsegundos y el segundo de nanosegundos.
- El tiempo de vida y la eficacia cuántica de fluorescencia de la referencia no deben verse afectados por la presencia del analito.
- La intensidad de fluorescencia del indicador debe variar en función de la concentración del analito.
- Los espectros de excitación de la referencia y el indicador deben solapar, de tal manera que pueda llevarse a cabo la excitación de ambos compuestos con la misma fuente de radiación y a una misma longitud de onda.
- Los espectros de emisión luminiscente de la referencia y el indicador también deben solapar, con el fin de que puedan ser detectados y medidos a un intervalo común de longitudes de onda y usando el mismo detector.

Al encontrarse DLR dentro de los métodos de fluorescencia resuelta en el tiempo, sus fundamentos se han aplicado tanto en el campo de frecuencias como en el campo de tiempos:

- DLR se implementó en primer lugar en el campo de frecuencias, utilizando una frecuencia de modulación de la luz lo más próxima posible a la asociada con el tiempo de vida del luminóforo de referencia. El desfase entre la excitación y la emisión son muy diferentes para referencia e indicador, puesto que sus tiempos de vida de luminiscencia también lo son. Experimentalmente se observa un desfase aparente que depende únicamente de la relación de intensidades existente entre los dos componentes (figura B.6).

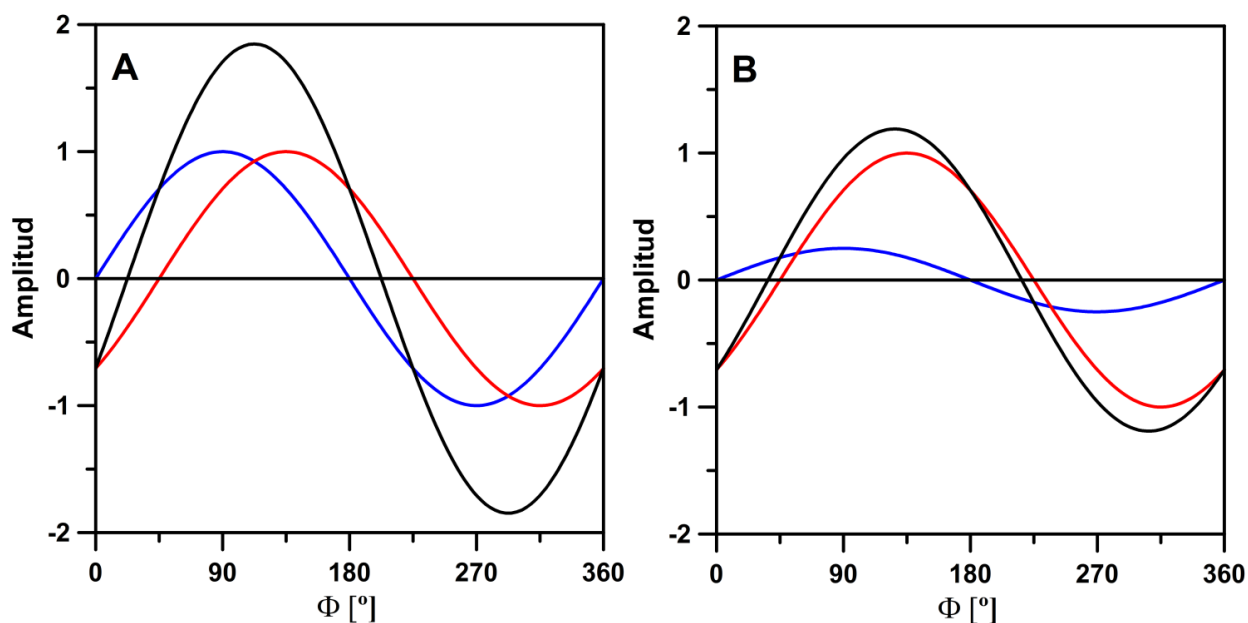


Figura B.6. Desfase de la luminiscencia total observada (en negro), de la referencia de tiempo de vida largo (en rojo) y del indicador de tiempo de vida corto (en azul) en el método DLR en el campo de las frecuencias. En el caso A, la fluorescencia del indicador no se encuentra atenuada; en el caso B, la presencia del analito provoca la atenuación de la fluorescencia del indicador.

Matemáticamente también se llega a esta misma conclusión, tal y como se indica a continuación. Las ecuaciones B.6 y B.7 expresan la superposición de las ondas de emisión de la referencia y el indicador:

$$A_o \cos \Phi_o = A_{ref} \cos \Phi_{ref} + A_{ind} \cos \Phi_{ind} \quad (B.6)$$

$$A_o \sin \Phi_o = A_{ref} \sin \Phi_{ref} + A_{ind} \sin \Phi_{ind} \quad (B.7)$$

donde A es la amplitud y Φ es el desfase de la señal aparente observada (o), del luminóforo de referencia (ref) o del indicador (ind), respectivamente.

En el caso de que la frecuencia de modulación sea óptima (la asociada al tiempo de vida de la referencia), la ecuación B.8 puede deducirse de la ecuación B.4.

$$tg \Phi_{ref} = 2\pi f_{mod} \tau_{ref} = 1 \Rightarrow f_{mod} = \frac{1}{2\pi \tau_{ref}} \quad (B.8)$$

De la ecuación B.8 se concluye que el desfase de la referencia es una constante, puesto que el τ_{ref} no se encuentra afectado por la presencia del analito.

De acuerdo también con la ecuación B.4, y teniendo en cuenta la ecuación B.8, la tangente del desfase del indicador puede escribirse como indica la ecuación B.9:

$$tg \Phi_{ind} = 2\pi f_{mod} \tau_{ind} = \frac{2\pi \tau_{ind}}{2\pi \tau_{ref}} = \frac{\tau_{ind}}{\tau_{ref}} \quad (B.9)$$

Como el tiempo de vida de la referencia es mucho mayor que el del indicador, el desfase de este último puede considerarse como cero (véase la ecuación B.10).

$$tg \Phi_{ind} = \frac{\tau_{ind}}{\tau_{ref}} \xrightarrow{\tau_{ind} \ll \tau_{ref}} 0 \Rightarrow \Phi_{ind} \rightarrow 0 \quad (B.10)$$

Por tanto, las ecuaciones B.6 y B.7 quedan simplificadas en las ecuaciones B.11 y B.12:

$$A_o \cos \Phi_o = A_{ref} \cos \Phi_{ref} + A_{ind} \quad (B.11)$$

$$A_o \sin \Phi_o = A_{ref} \sin \Phi_{ref} \quad (B.12)$$

Dividiendo entre sí las dos ecuaciones anteriores, se obtiene la ecuación B.13:

$$\frac{A_o \cos \Phi_o}{A_o \sin \Phi_o} = \cot g \Phi_o = \frac{A_{ref} \cos \Phi_{ref} + A_{ind}}{A_{ref} \sin \Phi_{ref}} = \cot g \Phi_{ref} + \frac{1}{\sin \Phi_{ref}} \frac{A_{ind}}{A_{ref}} \quad (B.13)$$

Esta última ecuación constata que el desfase aparente observado (Φ_o) depende únicamente de la relación entre las amplitudes de las ondas de emisión del indicador y la referencia. Como la concentración del luminóforo de referencia se mantiene constante y éste no se ve afectado por el analito, su intensidad luminiscente es también constante siempre. La concentración del indicador también se mantiene inalterada; sin embargo, su intensidad depende de la presencia o ausencia del analito, así como de la concentración de éste. Como resultado, la amplitud de la onda de emisión del indicador es mayor cuando no está atenuada por la presencia del analito, y, en definitiva, la cotangente del desfase aparente depende únicamente de la intensidad del indicador, es decir, de la concentración del analito.

Los primeros trabajos que hicieron uso de DLR en el campo de frecuencias demostraron su eficacia para determinar cloruros [225, 226]. Se trataba de un sensor óptico formado por una membrana que contenía tanto lucigenina (el indicador sensible al analito), como el complejo de referencia rutenio(II) tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) ($\text{Ru}(\text{dpp})_3$). Más tarde se desarrollaron sensores basados en el mismo principio para determinar nitratos [227], iones Cu^{2+} [228], 1-butilamina [229], oxígeno y dióxido de carbono [230] y amoníaco [231].

- También se han descrito métodos que hacen uso de DLR en el campo de tiempos. En este caso, el indicador de tiempo de vida corto y la referencia de tiempo de vida largo se excitan simultáneamente mediante un pulso de luz

procedente de LEDs. A continuación, la luminiscencia emitida se detecta e integra en dos ventanas temporales diferentes, tal y como ilustra la figura B.7.

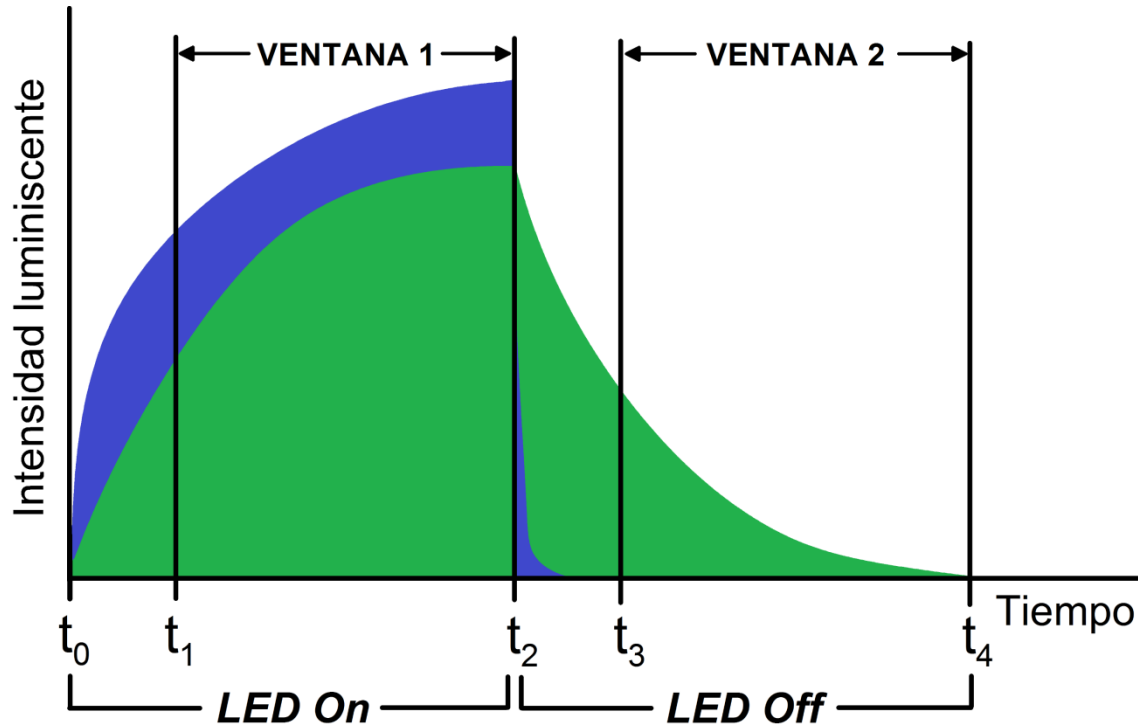


Figura B.7. Esquema utilizado en DLR en el campo de tiempos. Se muestran las dos ventanas, situadas la primera durante la excitación (LED On) y la segunda durante la emisión (LED Off), respectivamente. El color azul representa la luminiscencia del indicador de tiempo de vida corto y el color verde el de la referencia de tiempo de vida largo.

La primera ventana se encuentra abierta cuando la fuente de excitación está encendida (LED On), y la segunda cuando está apagada (LED Off) y después de un cierto tiempo de espera, muy breve, pero suficiente para que la señal luminiscente del indicador decaiga completamente. En estas condiciones, la luminiscencia detectada en la primera ventana es la suma de las intensidades luminiscentes del indicador y la referencia. Sin embargo, la luminiscencia detectada en la segunda ventana se debe exclusivamente a la emisión procedente de la referencia. Si ambas ventanas tienen la misma extensión temporal y la relación de concentraciones entre la referencia y el indicador no cambia durante

el análisis, la mayoría de las interferencias que afectan a la determinación quedan eliminadas al dividir la señal luminiscente de la primera ventana entre la de la segunda, obteniéndose el parámetro R (ecuación B.14).

$$R = \frac{Lum_{gate\ 1}(indicador) + Lum_{gate\ 1}(referencia)}{Lum_{gate\ 2}(referencia)} \Rightarrow R = a + bI_{Flu} \quad (B.14)$$

En la ecuación B.14, Lum es la luminiscencia detectada e integrada en cada caso e I_{Flu} es la intensidad de fluorescencia del indicador. Como puede observarse en dicha ecuación, el parámetro R depende exclusivamente de la intensidad de fluorescencia del indicador, la cual es un reflejo directo de la concentración del analito.

DLR en el campo de tiempos se utilizó por primera vez en el año 2001 por Liebsch y col. [206]. Estos investigadores desarrollaron un sensor óptico de pH consistente en una membrana que contenía carboxifluoresceína como indicador de tiempo de vida corto y sensible al pH y $Ru(dpp)_3$ como referencia de tiempo de vida largo. Recientemente, un esquema muy similar se utilizó para una aplicación *in vivo*, concretamente la obtención de imágenes en dos dimensiones que muestran la distribución del pH en el proceso de curación de heridas cutáneas en humanos [232]. También se han usado sensores similares para determinar iones Cu^{2+} [228], CO_2 [233] y Cd^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} [234].

En el capítulo final de la presente Memoria se amplía la técnica DLR (tanto en el campo de frecuencias como en el campo de tiempos) a la determinación de analitos fluorescentes en disolución. En este caso particular, la concentración de la referencia sigue manteniéndose constante en todas las muestras, pero la concentración de la especie con el tiempo de vida más corto se varía, de tal forma que esta especie se convierte en el analito a determinar, y tanto la cotangente del desfase como el parámetro R dependen únicamente de su concentración.

CAPÍTULO II
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

1. Optimización de los métodos químicos de análisis

Dado que las técnicas analíticas de análisis se usan generalmente para determinar cantidades muy pequeñas de los analitos de interés, es extremadamente importante identificar qué factores influyen en la determinación y en qué niveles deben ser fijados para obtener una respuesta analítica óptima (máxima sensibilidad, máxima reproducibilidad, mínimo error, mínimo número de interferencias, mínimo tiempo de análisis, etc.) A este proceso se le conoce como “optimización de un método de análisis”.

1.1. Optimización secuencial

El método tradicional para llevar a cabo una optimización se conoce como **optimización secuencial** o **factor a factor**. Este método implica tantos pasos en la optimización como variables o factores a optimizar haya. En cada uno de estos pasos, se varía uno de los factores manteniendo constantes todos los demás y, como resultado, se obtiene el valor óptimo para el factor estudiado. Los valores óptimos hallados se utilizan en las optimizaciones posteriores, de tal manera que al final del proceso todos los factores han sido optimizados.

Este sencillo procedimiento proporciona, en general, si no los valores óptimos, al menos valores muy cercanos a los óptimos para cada una de las variables y, por tanto, se utiliza comúnmente. Sin embargo, en ocasiones la utilización del método secuencial de optimización de factores puede conducir a valores erróneos en alguno de ellos, especialmente cuando no son independientes entre sí, sino que los valores de unos se encuentran muy influenciados por los de otros.

En estos casos, si se conociera exactamente cuál es la dependencia entre todas las variables, podría definirse una función objetivo que expresara su relación, y el

problema anterior podría solventarse matemáticamente, puesto que la optimización podría llevarse a cabo encontrando aquéllos puntos en los que se anulara la primera derivada de la función. Sin embargo, en la inmensa mayoría de las veces no se conoce la función objetivo, por lo que el problema no puede abordarse de esta forma.

1.2. Optimización por el método de simplex

1.2.1. Método de simplex clásicos

En 1962, Spendley y col. [235] publicaron un método alternativo de optimización basado en la utilización secuencial de figuras geométricas de máxima simetría o “simplex”, siendo el número de vértices de estas figuras igual al número de variables a optimizar más uno. Así, por ejemplo, los simplex son triángulos equiláteros en el caso de tener dos factores a optimizar, y tetraedros en el caso de tener tres. La simetría total de estas figuras implica que puede obtenerse un nuevo simplex que sea reflejo de uno ya existente mediante el simple cambio de uno de sus vértices.

En la figura 1 puede observarse gráficamente cómo tiene lugar la optimización por el método de simplex clásicos en el caso de tener dos variables y considerando que el punto óptimo se encuentra en el máximo de la función objetivo desconocida (por ejemplo, la máxima intensidad de fluorescencia). El proceso consta de los siguientes pasos:

- Se preparan tres muestras iniciales: A, B y C. Dichas muestras vienen definidas por ciertos valores de la variable x (en el eje de abscisas) y de la variable y (en el eje de ordenadas), y se escogen de tal manera que al unir los tres puntos (x , y) se obtenga un triángulo equilátero (simplex inicial).
- Se miden las intensidades de fluorescencia de las tres muestras anteriores y se comparan entre sí. Como se quiere maximizar la señal analítica, se rechaza la muestra menos fluorescente (A, en este caso), y se construye un nuevo simplex

mediante la reflexión del vértice rechazado con respecto al lado del triángulo que une los otros dos vértices.

- El nuevo simplex obtenido (BCD) se analiza de la misma forma. Como resultado, se rechaza el vértice B y, mediante reflexión, se obtiene un tercer simplex (CDE).
- Este proceso se repite sucesivamente, de tal forma que los simplex van avanzando hacia el punto óptimo (K). Cuando éste se ha alcanzado, nuevos simplex únicamente producen el giro del triángulo alrededor del mismo, hecho que indica el final del proceso de optimización.

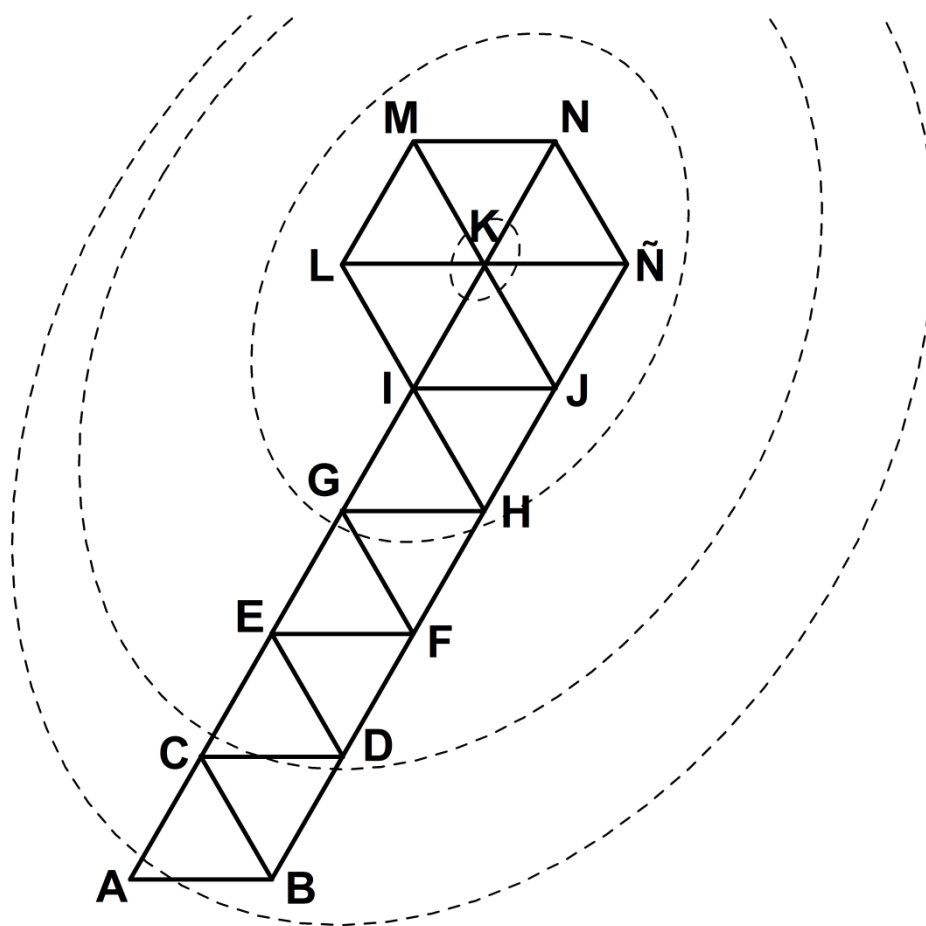


Figura 1. Proceso de avance de un simplex regular clásico.

Hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- En ocasiones, el nuevo vértice produce una señal analítica igual o menor al vértice eliminado en el paso precedente. Cuando esto ocurre, el simplex deja de progresar, puesto que se produce la oscilación entre ambas posiciones. Si esto ocurre, para continuar con la optimización se efectúa la reflexión sobre el vértice que proporciona el segundo menor valor en la señal analítica.
- Una exacta coincidencia en la rotación del simplex al final del proceso sólo tiene lugar cuando se manejan triángulos equiláteros, ya que figuras con más vértices tienen infinitos planos de rotación sobre un punto.
- Una vez alcanzado el punto óptimo, a veces resulta conveniente ensayar tamaños menores para el simplex, con el fin de comprobar si el punto considerado como óptimo se trata realmente del valor máximo absoluto o sólo de un máximo relativo.
- A veces, el avance del simplex conduce a vértices situados fuera de los límites del campo experimental (como un pH de 46 o un porcentaje de etanol del -50%). Esto puede indicar que la superficie de respuesta no presenta un máximo o un mínimo en el campo experimental estudiado, pero también puede deberse a un “despiste” momentáneo del simplex. Si se trata del segundo caso, el simplex debe evolucionar hacia el punto óptimo al hacerle cambiar bruscamente de dirección (lo cual se consigue asignando arbitrariamente una respuesta muy mala al vértice que viola los límites del campo).

En la optimización mediante simplex no se recomienda hacer replicados de cada vértice y evaluar el valor medio de la respuesta, con el fin de conservar una de las mayores ventajas del proceso, que es la rapidez en la optimización de todas las variables. Sin embargo, esta decisión tiene como consecuencia la no eliminación de errores aleatorios, los cuales podrían influir negativamente en el avance del simplex:

- La obtención de un resultado anormalmente bajo produciría un cambio de dirección hacia zonas alejadas del óptimo. Este hecho no es muy grave porque en los siguientes experimentos no se obtendrían resultados mejores que en el paso precedente, lo cual obligaría al simplex a cambiar de nuevo su dirección, de tal forma que al final acabaría encontrando el camino correcto a pesar del error. Únicamente se habría perdido un poco de tiempo y esfuerzo, al realizar más experimentos de los estrictamente necesarios.
- Si, por el contrario, debido a un error aleatorio se produce un resultado anormalmente elevado, las consecuencias sí son graves, ya que ello implicaría el mantenimiento del vértice erróneo en simplex posteriores, de tal forma que puede aparentar ser el óptimo buscado. Si se sospecha que esto ha podido ocurrir, se recomienda volver a repetir la medida del vértice que aparenta ser anómalo, ya que es altamente improbable que un error accidental se reproduzca al repetir el experimento en otro momento diferente. De esta forma podría averiguarse si el vértice en cuestión corresponde a una localización cercana al óptimo o se debe a una medición errónea.

La formulación matemática de cada nuevo vértice de un simplex según el modelo clásico de Spendley viene dada por la ecuación 1:

$$P_j^* = P(P - P_j) \quad (1)$$

donde P_j^* es el nuevo vértice que resulta de la reflexión del vértice eliminado (P_j) con respecto al punto P , el cual es el centroide del hiperplano resultante al eliminar P_j , y está expresado por la ecuación 2:

$$P = \left(\frac{1}{k}\right) (P_1 + P_2 + P_{j-1} + \cdots + P_{j+1} + \cdots + P_k + P_{k+1}) \quad (2)$$

siendo k el número de vértices, cada uno de los cuales está representado por un vector, desde P_1 hasta P_{k+1} .

La máxima simetría de los simplex de Spendley tiene el inconveniente de que el número de experimentos necesarios para llegar al punto óptimo puede ser muy elevado si se comienza el proceso en un punto alejado del mismo. E, incluso aunque éste no sea el caso, generalmente el trabajo experimental se ve incrementado de todas formas por la necesidad de utilizar cada vez simplex de menor tamaño con el fin de acotar mejor el punto óptimo.

1.2.2. Método del simplex modificado

El “método del simplex modificado” (MSM), propuesto por Nelder y Mead en 1965 [236], supone una gran mejora frente al modelo clásico, al utilizar simplex que no sólo pueden reflejarse, sino también expandirse y contraerse. Esto permite reducir el número de experimentos, ya que es posible avanzar más rápidamente en la dirección del óptimo cuando se está alejado del mismo (mediante expansiones) y más lentamente (mediante contracciones) cuando ya se está próximo a él. Sin embargo, hay que tener cuidado de no efectuar expansiones o contracciones exageradas, ya que pueden provocar “degeneración direccional”, es decir, influir negativamente en la capacidad del simplex para cambiar de dirección.

De esta forma, cada paso del proceso de optimización mediante simplex modificados consta, a su vez, de dos etapas. La primera es siempre la reflexión del peor punto del simplex de partida para obtener un nuevo punto. La segunda etapa puede ser una expansión, una contracción positiva o externa al simplex original, una contracción negativa o interna, o no ser necesaria, dependiendo del valor del nuevo punto.

La figura 2 ilustra todos estos casos. En este ejemplo, se parte de la evaluación del simplex triangular de máxima simetría ABC, y se concluye que el peor resultado viene dado por el vértice A y el mejor por el vértice B. Se efectúa entonces la primera etapa del proceso: una reflexión con respecto al lado BC, obteniéndose el nuevo simplex ABD. La segunda etapa de la optimización puede tener lugar de tres formas diferentes:

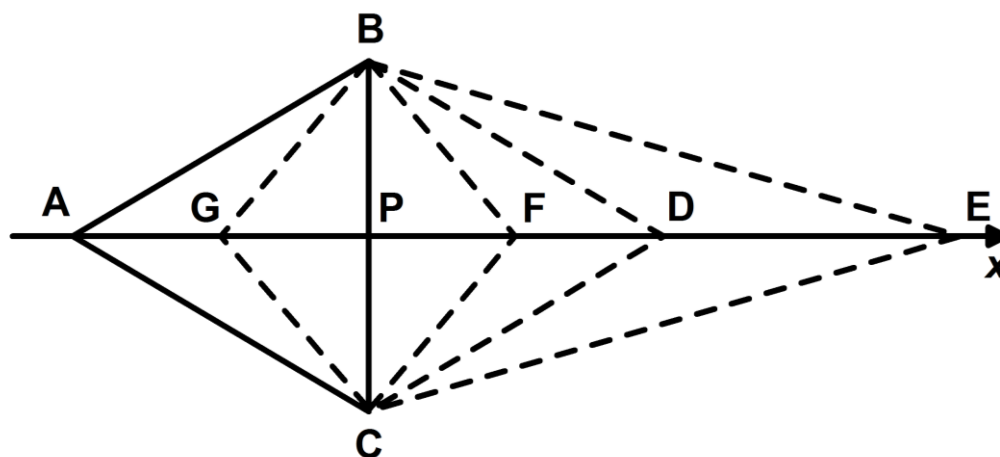


Figura 2. Operaciones básicas para el movimiento de un simplex modificado de Nelder y Mead.

- Si se observa que en D se obtiene una respuesta mucho mejor que en A, B o C, se supone que la dirección x es la correcta para llegar al punto óptimo. En este caso sería útil una expansión del simplex hasta el vértice E, con el fin de acortar el proceso de optimización.
- Si se observara que en D se obtiene una respuesta mejor que las de A, C pero peor que la de B, es lógico suponer que la dirección del punto óptimo no coincide exactamente con x, de tal manera que se rechazaría el punto C y se produciría un cambio de dirección.
- Si se observara que la respuesta en D es peor que las de B y C, aunque mejor que la de A, podría pensarse que el simplex BCD es demasiado grande, de tal manera que el punto óptimo podría encontrarse en su interior. Consecuentemente, en este caso se produciría una contracción externa del simplex original ABC, originando el vértice F. Sin embargo, podría darse el caso de que la respuesta de F fuera también peor que las respuestas de B y C, lo cual indicaría con toda probabilidad que el punto óptimo se encuentra dentro del

simplex original, por lo que sería interesante contraer internamente el mismo y medir la señal analítica en el vértice G.

Matemáticamente, cada nuevo punto de un simplex de Nelder y Mead viene dado por la ecuación 3:

$$P_j^* = P + \alpha (P - P_j) \quad (3)$$

donde α es un coeficiente que determina la operación a realizar. Así, inicialmente, $\alpha=1$, y la ecuación 3 se reduce a la ecuación 2, es decir, tiene lugar una reflexión. Como se ha visto, a continuación se ensaya una expansión, lo cual implica $\alpha > 1$, generalmente $\alpha=2$. Si la expansión falla, se prueba entonces la contracción externa ($0 \leq \alpha \leq 1$), y si ésta tampoco supone una mejora, la contracción interna ($-1 \leq \alpha \leq 0$). En general, las contracciones tienen lugar con $\alpha = \pm 1/2$.

Si se lleva al extremo el concepto del simplex modificado, se obtiene el llamado “método de contracción masiva”, que consiste en iniciar la búsqueda con un simplex de gran tamaño, de tal forma que el óptimo debe encontrarse en su interior. A partir de este simplex inicial, todos los movimientos suponen contracciones hasta alcanzar el punto óptimo.

1.2.3. Método del simplex del centroide ponderado

Ryan y col. propusieron en 1980 [237] una nueva modificación del método de simplex, dando lugar al “método del simplex del centroide ponderado” (WCM). Este método también está encaminado a la modificación del simplex original de tal manera que se mejore la rapidez en la aproximación al óptimo. Con este fin, estos autores propusieron que la reflexión con respecto al hiperplano no se realizara a través del centroide P definido por la ecuación 1, sino a través de un centroide ponderado (P_w) que viene dado por la ecuación 4:

$$P_w = \frac{\sum_{i \neq A}^{k+1} \{R(P_i) - R(A)\} P_i}{\sum_{i \neq A}^{k+1} \{R(P_i) - R(A)\}} \quad (4)$$

donde $R(P_i)$ representa la respuesta del vértice P_i y $R(A)$ la respuesta en el peor vértice (A). El sumatorio se halla normalizado con el fin de evitar que el centroide ponderado quede situado fuera del hiperplano. Esta restricción obliga a continuar la búsqueda en la dirección determinada por puntos de respuesta conocida, evitando reflexiones en regiones de las que no se posee suficiente información.

De la ecuación 4 puede deducirse que los vértices más favorables (aquellos que proporcionen un mayor cambio en la respuesta con respecto al peor vértice, A) tienen mayor peso a la hora de determinar el centroide ponderado. Así, por ejemplo, en la figura 3 el vértice A produce la peor respuesta, el vértice C una respuesta intermedia y el vértice B la mejor respuesta. Al aplicar a esta situación la ecuación 4, se obtiene un centroide situado en el lado BC, pero no en el centro, como en el caso del método simplex de Spendley, sino más cercano al vértice B. Este hecho es muy ventajoso, ya que un avance en la dirección que pasa por el punto P_w será más eficaz para localizar el óptimo que otra que pase a través del punto P.

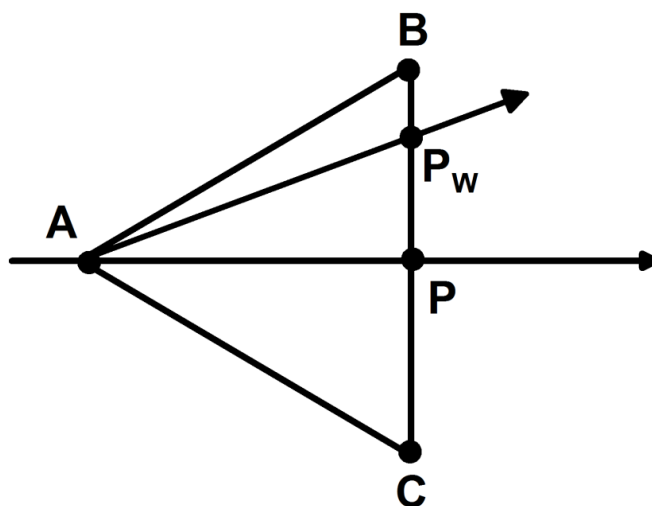


Figura 3. Dirección del avance de un simplex considerando el método del centroide ponderado.

1.2.4. Simplex utilizados en la presente Memoria

En dos de los trabajos que recoge esta Memoria se hace uso de la optimización mediante simplex utilizando un algoritmo que combina las modificaciones de Nelder y Mead [236] y las de Ryan y col. [237], ya que se considera que así se obtiene la máxima convergencia, es decir, una mayor eficacia en el proceso de optimización. Este método no tiene por qué partir de figuras de máxima simetría, lo cual supone una gran ventaja cuando las magnitudes de las variables a optimizar son muy diferentes entre sí, como por ejemplo el pH y la concentración de algún reactivo. En efecto, un simplex de máxima simetría obligaría a seleccionar un intervalo de concentraciones para ese reactivo en el que se supone que se encuentra el punto óptimo. En cambio, si se parte de figuras que no presentan máxima simetría, las variables pueden desplazarse hasta en tres órdenes de magnitud tras diez experimentos, por lo que no es necesario presuponer un intervalo en el que hipotéticamente se encuentre el máximo.

Además, las figuras usadas en este método están construidas de tal forma que en uno de los vértices las aristas que confluyen son ortogonales (un triángulo rectángulo para dos variables, una pirámide trigonal para tres...), como muestra la figura 4. Esta estrategia tiene la ventaja de simplificar enormemente los cálculos con respecto al uso de simplex contruidos de otras formas, incluyendo los de completa simetría.

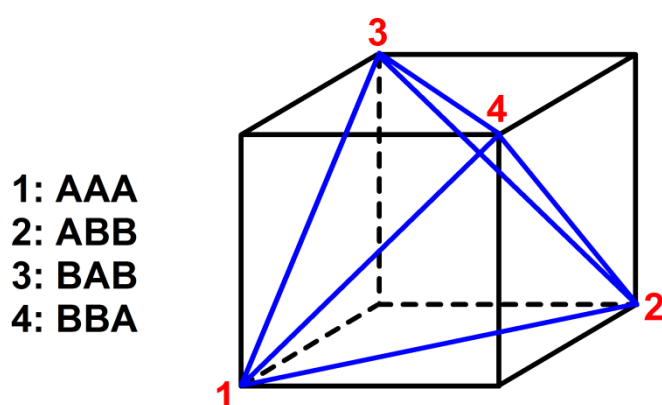


Figura 4. Distribución ortogonal de los puntos del simplex inicial en el caso de tener tres factores a optimizar.

A continuación se expone un ejemplo, en el cual se parte de la evaluación del simplex triangular ABC, y se concluye que el mejor resultado viene dado por el vértice B y el peor por el vértice A. Se efectúa entonces la primera etapa del proceso iterativo: una reflexión con respecto al lado BC, obteniéndose el nuevo simplex ABD. Llegado este punto, pueden darse cuatro casos:

- **Caso 1:** en D se obtiene una respuesta comprendida entre las respuestas de B y C. En este caso, no es necesaria una contracción ni una expansión, de tal forma que se da por acabado el primer paso de optimización y se comienza el segundo con el nuevo simplex BCD. Es decir, se produce un cambio de dirección.

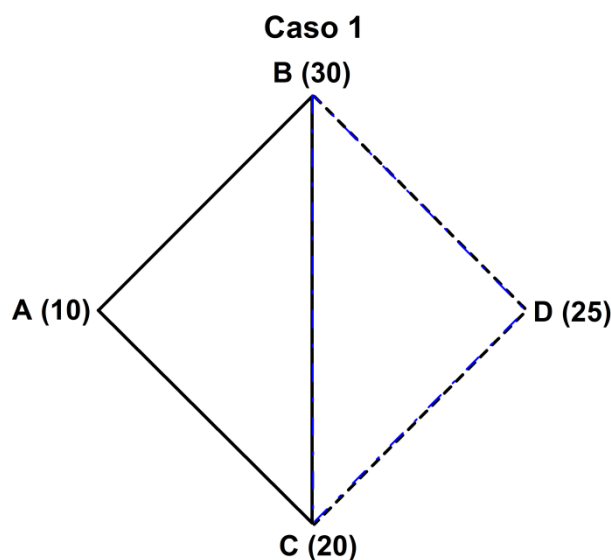


Figura 5. Caso 1 en la evaluación de un simplex por el método utilizado en esta memoria.

- **Caso 2:** en D se obtiene una respuesta mucho mejor que en A, B o C. Por tanto, se supone que la dirección seguida es la correcta para llegar al punto óptimo. En este caso tiene lugar una expansión del simplex hasta el vértice E, con el fin de acortando el proceso de optimización. Si la respuesta de E es superior a la de B, se acepta la expansión y se hace un nuevo simplex a partir del triángulo BCE (**caso 2a**). Si la respuesta de E es inferior a la de B, se rechaza la expansión, volviéndose al simplex BCD (**caso 2b**).

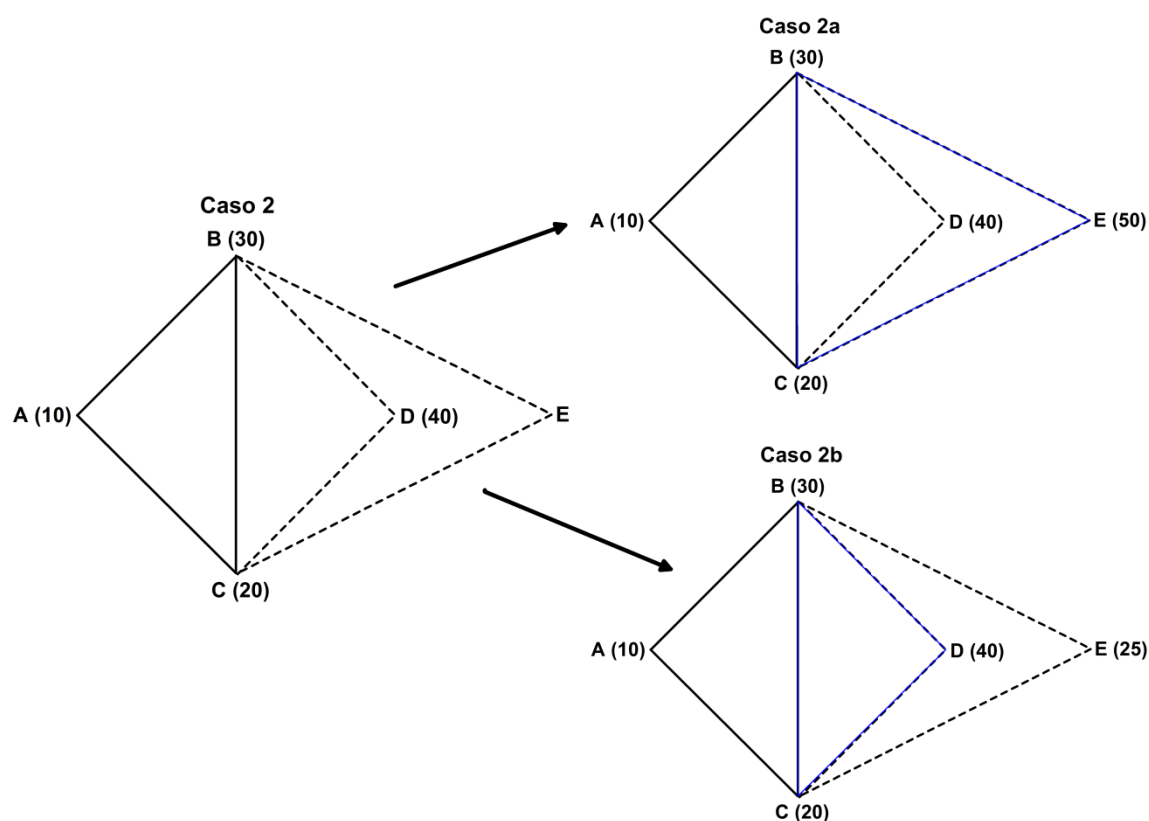


Figura 6. Caso 2 en la evaluación de un simplex por el método usado en esta memoria.

- **Caso 3:** la respuesta en D está comprendida entre las señales de los vértices intermedio y peor (C y A). Se considera entonces que el simplex BCD es demasiado grande, de tal manera que el punto óptimo podría encontrarse en su interior. Consecuentemente, en este caso se produciría una contracción externa del simplex original ABC, originando el vértice F. Si la respuesta de F es mayor que la de D, se da por finalizado el simplex y se hace uno nuevo a partir del triángulo BCF (**caso 3a**). Si la respuesta en F es peor que en D, se hace un nuevo simplex considerando el mejor punto (B) y las medias (C' y D') de las respuestas de cada uno de los otros dos con la del mejor (**caso 3b**), es decir:

$$C' = \frac{C+B}{2} \quad \text{y} \quad D' = \frac{D+B}{2} \quad (5 \text{ y } 6)$$

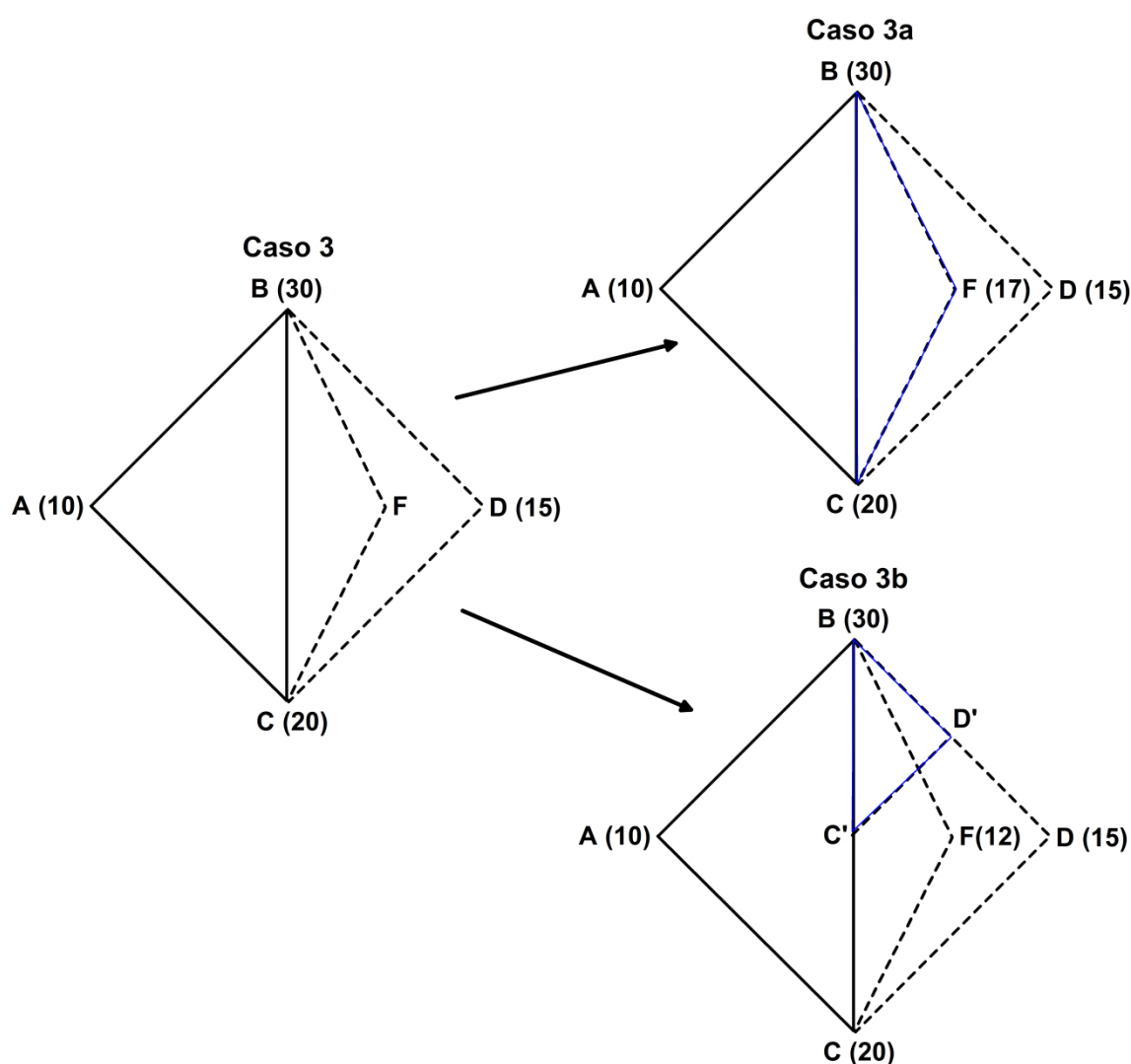


Figura 7. Caso 3 en la evaluación de un simplex por el método usado en esta memoria.

- **Caso 4:** la respuesta en D es peor que la obtenida en el peor vértice inicial (A). Este hecho se considera indicativo de que el punto óptimo se encuentra dentro del simplex original, por lo que tiene lugar una contracción interna del mismo, dando lugar al vértice G. Si la respuesta en G es mayor que la respuesta en D, se da por finalizado el simplex y se hace uno nuevo con el triángulo BCG (**caso 4a**). Si no lo es, los puntos A y C se recalculan promediándolos con B para obtener los puntos A' y C' (análogamente a las ecuaciones 5 y 6) y se continúa el proceso de optimización con el simplex A'BC' (**caso 4b**).

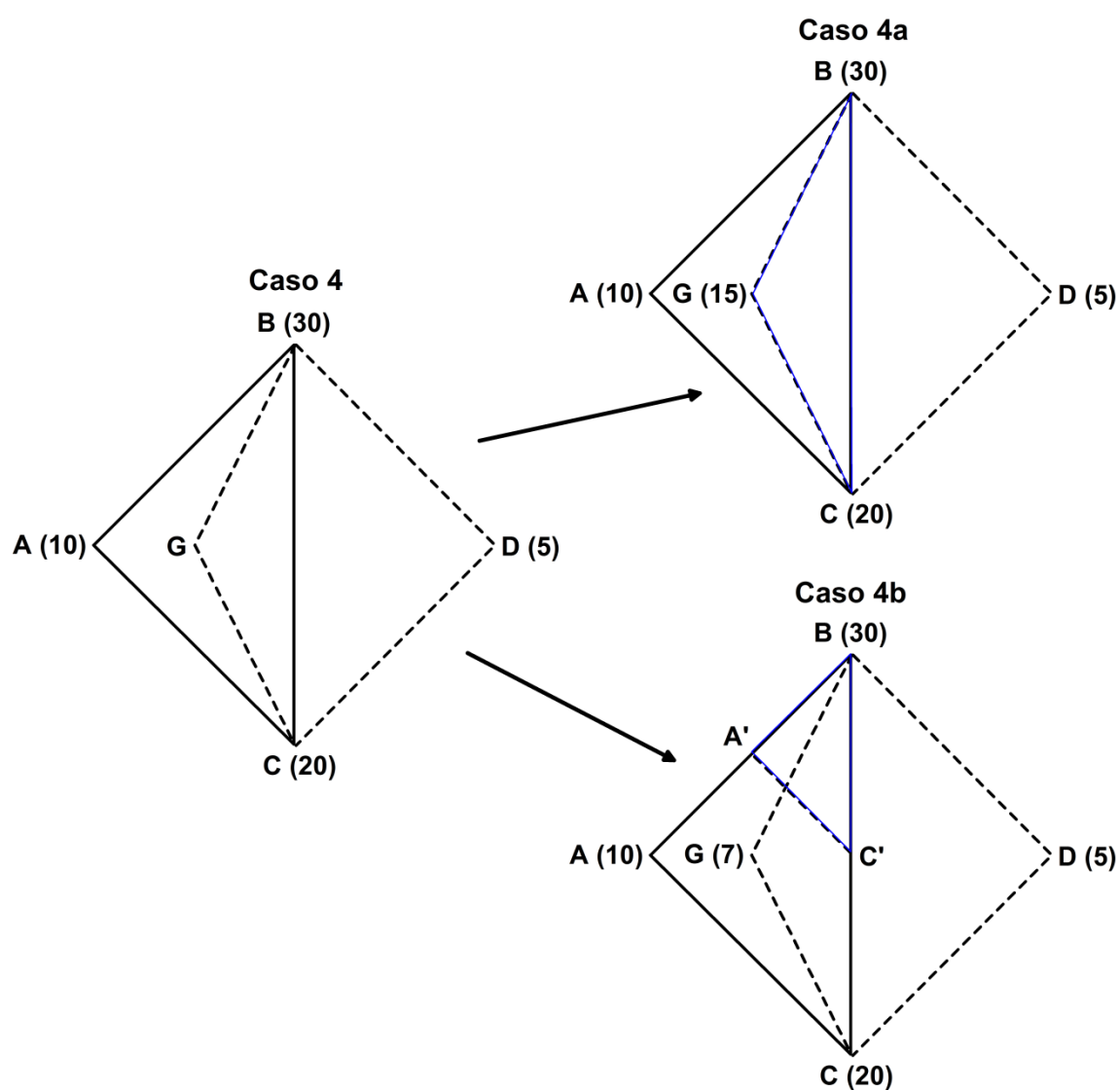


Figura 8. Caso 4 en la evaluación de un simplex por el método usado en esta memoria.

A modo de resumen, la figura 9 muestra, en un diagrama de flujo, los diferentes casos que pueden darse en cada etapa de optimización utilizando los simplex con las modificaciones de Nelder y Mead [236] y de Ryan y col. [237].

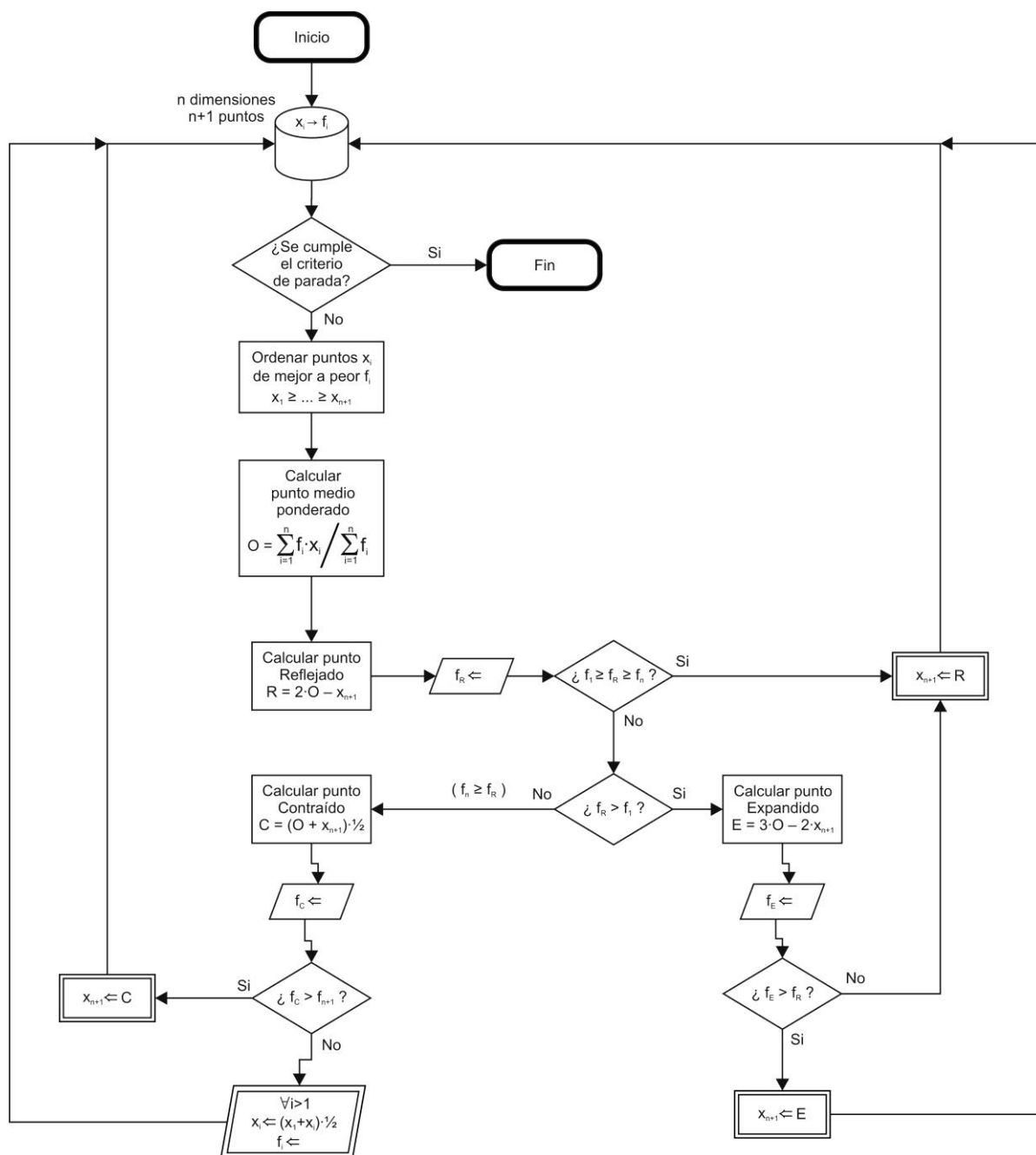


Figura 9. Diagrama de flujo del algoritmo de optimización simplex empleado en esta Memoria.

2. Calibración y regresión

2.1. Introducción

Entre las variables que afectan a un mismo fenómeno suele haber correlación, es decir, los valores de éstas están ligados entre sí de algún modo, de manera que la medida de una de estas variables proporciona información sobre las demás. Así, por ejemplo, la medida de cierta propiedad analítica de un compuesto puede servir para determinar su concentración, siempre que entre ambas variables exista una correlación conocida, es decir, un modelo matemático. A este modelo matemático se le conoce como “ecuación de predicción”, y a su desarrollo para cada caso concreto, “calibración”.

En algunos casos, basta con medir una variable para predecir una variable correlacionada con ella. Los métodos para llevarlo a cabo se conocen como “métodos de regresión simple”. Sin embargo, en otras ocasiones, es necesario tener en cuenta varias variables para predecir una respuesta o varias respuestas interdependientes. Se utilizan entonces “métodos de regresión multivariante”. En esta Tesis se hace uso de ambos tipos de métodos.

2.2. Calibración y regresión simples

2.2.1. Modelo para la regresión simple

El proceso para establecer un modelo de regresión se conoce como “análisis de regresión”, y puede ser de dos tipos:

- En la regresión de tipo I se tiene un control sobre una de las dos variables correlacionadas, de tal manera que sus valores son conocidos o se pueden

seleccionar previamente con gran precisión. En cambio, no se tiene control sobre la otra variable, cuyos valores están asociados a una incertidumbre apreciable.

- En la regresión de tipo II no existe un control sobre ninguna de las dos variables correlacionadas, por lo que pueden estar sujetas a incertidumbres del mismo orden.

Si el problema es de tipo I, la variable controlada se denomina independiente y se suele representar con la letra x , mientras que la no controlada es la variable dependiente, o y . En el caso más simple, la relación entre ambas variables es lineal, y viene dada por la ecuación 7:

$$y = \alpha + \beta x + \varepsilon \quad (7)$$

donde α y β son, respectivamente, la ordenada en el origen y la pendiente de la recta que correlaciona ambas variables, y ε es el error asociado a la variable y , o diferencia entre el resultado observado y el predicho por el modelo.

Como α y β son valores teóricos, nunca pueden hallarse empíricamente con certeza absoluta. Sin embargo, puede hacerse una estimación de los mismos. Para ello, se mide la variable dependiente de un conjunto de n estándares con valores conocidos de la variable independiente y los n pares de medidas (x_i, y_i) se utilizan para obtener los coeficientes a y b en la llamada “ecuación de regresión” o “ecuación de predicción” (ecuación 8).

$$\hat{y} = a + bx \quad (8)$$

siendo \hat{y} la predicción de y , a la estimación de α y b la estimación de β .

Todo proceso de calibración para obtener los coeficientes de regresión a y b conlleva errores, los cuales se conocen como residuales o residuos (e_i) y pueden

calcularse, para cada x_i , como la diferencia entre el valor real observado (y_i) y el valor predicho (\hat{y}), tal y como establece la ecuación 9:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (9)$$

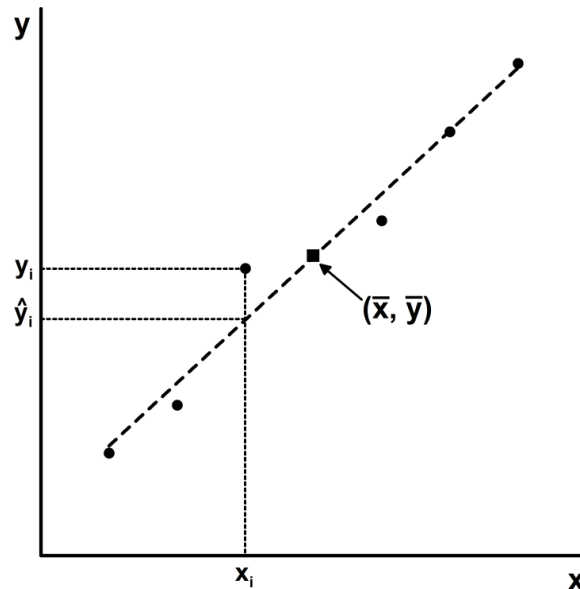


Figura 10. Estimación de la recta de regresión, mostrando los puntos experimentales y el centroide, o punto (\bar{x}, \bar{y}) .

Sin embargo, al tratarse de un hipotético problema de tipo I, se considera que los errores asociados a cada x_i son inexistentes o, al menos, despreciables frente a los residuales de la variable dependiente.

2.2.2. Método de mínimos cuadrados

El método más frecuente para estimar los coeficientes de un modelo de regresión lineal es el método de mínimos cuadrados, el cual consiste en minimizar la suma de los cuadrados de los residuales, es decir, la ecuación 10:

$$\sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2 \quad (10)$$

Derivando respecto de a y de b e igualando ambas derivadas a cero, se obtiene el sistema de ecuaciones dado por las ecuaciones 11 y 12:

$$\sum y_i = an + b \sum x_i \quad (11)$$

$$\sum x_i y_i = a \sum x_i + b \sum x^2 \quad (12)$$

La ecuación que permite calcular la pendiente de la recta de regresión, se obtiene directamente despejando b del anterior sistema de ecuaciones:

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (13)$$

donde \bar{y} y \bar{x} son los valores medios de y y x , respectivamente.

Además, al dividir la ecuación 11 entre n , se obtiene:

$$\bar{y} = a + b\bar{x} \quad (14)$$

Esta última ecuación indica que la recta de regresión siempre pasa por el centroide, o punto (\bar{x}, \bar{y}) y permite calcular la ordenada en el origen a :

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (15)$$

Una vez obtenida la ecuación de regresión $\hat{y} = a + bx$, pueden calcularse tres varianzas de interés:

- Varianza “explicada” por el modelo (s_{exp}^2), o suma de los cuadrados de las desviaciones de los valores predichos respecto al centroide en la dirección de la variable x , dividida por el número de grados de libertad, que es uno (dos grados debidos a \hat{y}_i menos uno debido a \bar{y}), es decir:

$$s_{exp}^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 = SC_{exp} \quad (16)$$

- Varianza residual (s_{res}^2), que, análogamente a la anterior, es la suma de los cuadrados de las desviaciones de los puntos en la dirección de la variable y , entre el número de grados de libertad:

$$s_{res}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} = \frac{SC_{res}}{n-2} \quad (17)$$

- Varianza total de los puntos en ausencia de modelo (s_T^2), que se calcula como la suma de los cuadrados de las desviaciones de los puntos respecto al centroide, dividida entre el número de grados de libertad:

$$s_T^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1} = \frac{SC_T}{n-1} \quad (18)$$

Como puede verse, $SC_T = SC_{exp} + SC_{res}$. Es decir, el método divide la varianza total en dos: la explicada por el modelo y la residual. La evaluación de la calidad del ajuste de la recta de regresión a los datos experimentales puede hacerse mediante el cálculo de la varianza residual, ya que ésta se considera un parámetro indicativo de la precisión del modelo. Sin embargo, tiene el inconveniente de depender de las unidades de medida de la variable, por lo que no es útil para la comparación de métodos. Por este motivo, para medir la bondad del ajuste se recomienda el uso del llamado “coeficiente de la determinación” (R^2), que es adimensional, ya que se calcula como el cociente entre la varianza explicada y la total, tal y como muestra la ecuación 19.

$$R^2 = \frac{SC_{exp}}{SC_T} = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (19)$$

Así, el valor de R^2 expresa en qué proporción la varianza de los datos queda expresada por el modelo. Un ajuste perfecto da como resultado $R^2 = 1$, ya que la varianza explicada es el 100% de la total ($SC_{exp} = SC_T$). Mientras que si no existe correlación lineal entre las variables, $R^2 = 0$, puesto que la varianza explicada es el 0% de la total ($SC_{exp} = 0$).

Es conveniente señalar que para que los resultados obtenidos en un modelo de regresión por mínimos cuadrados sean válidos, es necesario comprobar que se cumplen cuatro requisitos:

- El problema de regresión es de tipo I, es decir, los errores aleatorios son despreciables en x y predominantes en y .
- La relación entre x e y es lineal en el intervalo considerado.
- Los residuales son homocedásticos, es decir, su varianza es independiente de x . Esto implica que deben estar distribuidos aleatoriamente y que su media debe ser cero.

En el caso de que los datos obtenidos sean heterocedásticos, es más adecuado utilizar el método de regresión conocido como “mínimos cuadrados ponderados”, mediante el cual los puntos de menor incertidumbre tienen más importancia en el análisis.

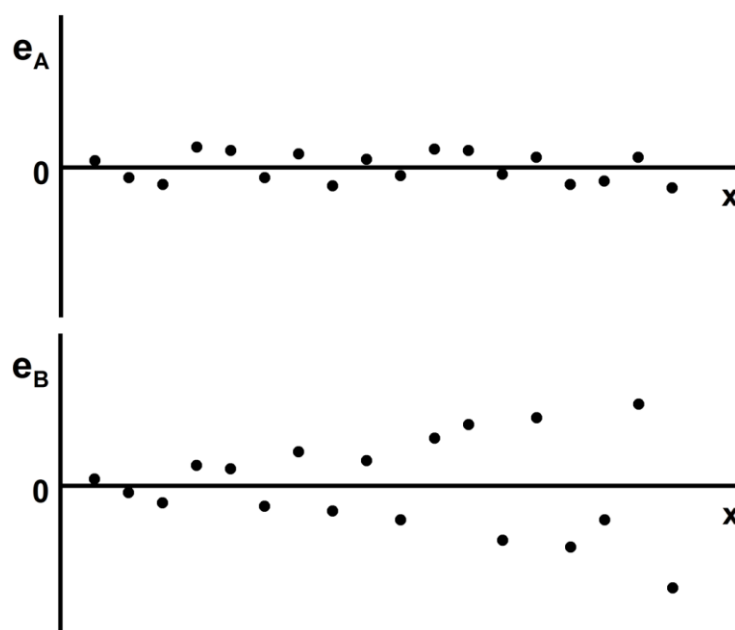


Figura 11. Gráfico de residuales para los casos de una distribución homocedástica (arriba) y heterocedástica (abajo).

- No existen puntos discrepantes ni puntos leva entre los datos introducidos en el modelo, siendo un punto discrepante (o “outlier”) aquél que mantiene constante el valor medio de x_i (\bar{x}) pero hace variar el valor medio de y_i (\bar{y}), y un punto leva aquél que modifica \bar{x} sin producir cambios en \bar{y} . Si se sospecha de la presencia de algún dato discrepante o leva, es conveniente emplear para la regresión un método que esté menos influenciado por la presencia de dichos puntos que el de mínimos cuadrados, es decir, un método más “robusto”. El método de “mínima mediana de cuadrados” suele ser el elegido en este caso, ya que minimiza las desviaciones con respecto a la mediana de los cuadrados de los residuales (y no con respecto a su sumatorio), y la mediana es un estadístico menos sensible a grandes desviaciones con respecto al grueso de los datos.

2.2.3. Método de las adiciones estándar o calibración interna

En numerosas ocasiones, la interacción del analito con su entorno físico-químico produce bien una exaltación, bien una inhibición de la sensibilidad del método analítico, hecho que se conoce como “efecto matriz”. Si este efecto se manifiesta como una exaltación de la sensibilidad, se produce un error sistemático por exceso en la medida, mientras que el error es por defecto si la sensibilidad del método se ve inhibida. Ambos efectos pueden observarse en la figura 12.

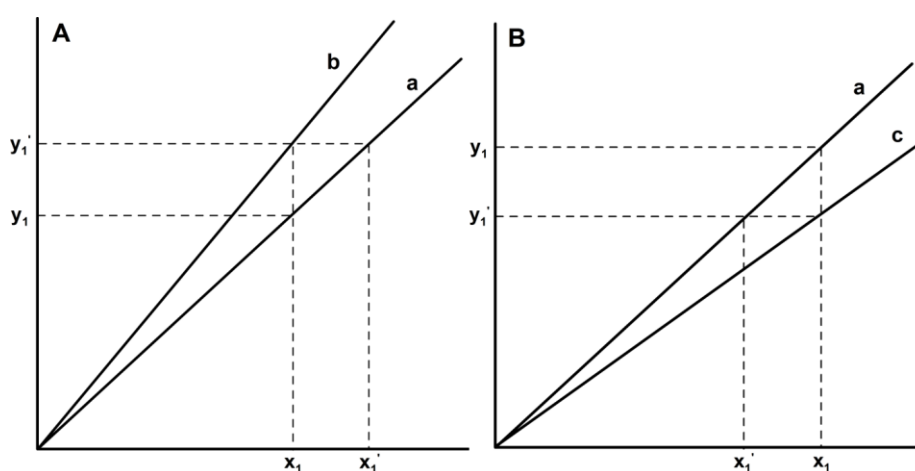


Figura 12. Rectas de calibrado sin efecto matriz (a) y con exaltación (b) e inhibición (c) de la sensibilidad. En el caso A se comete un error sistemático por exceso y en el caso B por defecto.

Si la matriz no es compleja, pueden eliminarse estos efectos indeseados tratando de imitar artificialmente la composición de la muestra en la preparación de los estándares. Sin embargo, este procedimiento, conocido como “calibración externa”, no es posible en el caso de matrices complejas, como suelen ser las de origen biológico. En estos casos, resulta particularmente útil la aplicación del método conocido como “calibración interna”, “método de las adiciones estándar” o “método de adiciones de patrón”, el cual consiste en obtener la recta de calibrado mediante la medida de estándares que contengan la misma cantidad de la muestra. Además, a estas disoluciones patrón se las añade cantidades crecientes y conocidas de un estándar del analito que se quiere determinar en la muestra. Puede demostrarse que, estadísticamente, los resultados no mejoran apreciablemente con un número de estándares superior a cuatro. Consecuentemente, en el método de adiciones estándar cuatro es el número más común de patrones usados.

Es imprescindible también la preparación y el análisis de un blanco, con el fin de eliminar el efecto de las interferencias, es decir, el desplazamiento del cero debido a señales no producidas por la presencia del analito. La necesidad del blanco se debe a que este método de calibración inicia su escala de coordenadas a la señal del blanco y, consecuentemente, ésta debe restarse de todas las medidas. Si se utiliza como cero de ordenadas la señal dada por el disolvente puro o el cero del instrumento, puede cometerse un error sistemático más que considerable.

Para el desarrollo de un método de adiciones estándar se aplica cualquiera de los métodos de regresión lineal vistos anteriormente, siendo el más común el de mínimos cuadrados. Sin embargo, la predicción (el cálculo de la concentración de analito en la muestra) se realiza de forma diferente. Como muestra la figura 13, la predicción se calcula mediante la extrapolación de la recta de calibrado, siendo el valor de concentración predicho (c_p) el punto de corte entre la recta extrapolada y el eje de abscisas, pero con signo positivo (ya que una concentración nunca puede ser negativa). Matemáticamente, el valor de este punto es el cociente entre la ordenada en el origen y la pendiente de la recta (ecuación 20):

$$\hat{y} = a + bc_p \rightarrow c_p = -\frac{a}{b} \quad (20)$$

donde el signo negativo indica solamente que la lectura se hace en la parte negativa del eje de abscisas.

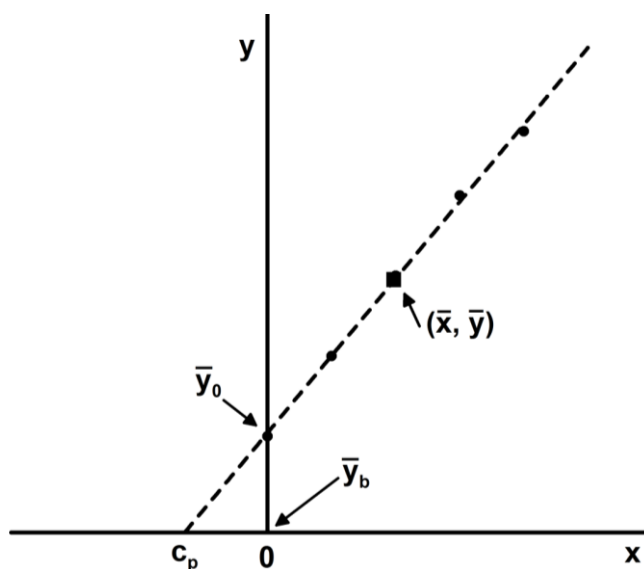


Figura 13. Calibración por el método de las adiciones estándar. Se muestran los puntos experimentales y el centroide. El origen del eje de ordenadas está situado en la media de las señales del blanco (\bar{y}_b).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el método de las adiciones estándar tiene las siguientes limitaciones:

- Como se trata de un método de extrapolación, la medida de la muestra tiene lugar lejos del centroide. En consecuencia, las varianzas obtenidas son mayores que en el caso de los métodos de calibración vistos anteriormente.
- Si la relación señal-concentración no es lineal, el método de adiciones estándar no puede, en principio, aplicarse, ya que en la gran mayoría de casos es extremadamente complicado, impreciso e inexacto extrapolar una curva (a no ser que se disponga de un modelo muy fiable).

- El trabajo experimental es mayor en el método de adiciones estándar que en un calibrado convencional, debido a que la calibración debe repetirse para cada muestra. Esto es así porque, en general, el efecto matriz varía de unas muestras a otras. Sin embargo, si se demuestra que el efecto matriz se mantiene constante al cambiar de muestra, el método de adiciones deja de ser necesario, ya que la pendiente del calibrado puede multiplicarse por un coeficiente que corrija el error sistemático.
- El método de adiciones estándar implica, como se ha visto, un mayor gasto de muestra, lo cual puede ser un problema cuando se dispone de cantidades muy limitadas de la misma.

2.2.4. Comparación de rectas de calibrado. Análisis de varianza

Cuando se quiere resolver muestras de analitos o determinar uno o varios analitos en presencia de matrices complejas es conveniente obtener rectas de calibrado a diferentes concentraciones o en presencia de diferentes matrices (por ejemplo, orinas procedentes de personas distintas), a fin de evaluar si realmente existen interferencias en las determinaciones. Las distintas rectas se obtienen, frecuentemente, a partir de estándares con idénticos valores en las concentraciones de los analitos, pero que manifiestan diferencias en la señal analítica que producen debido a la variabilidad de la matriz. Estas variaciones en la señal analítica pueden estudiarse utilizando varias técnicas estadísticas, siendo una de las más sencillas y utilizadas el análisis de varianza.

En el análisis de varianza, la evaluación estadística del error se lleva a cabo desglosando la varianza total en sus distintas fuentes de error, es decir, la variación entre los k calibrados efectuados y la variación de cada muestra dentro de los calibrados. En consecuencia, el diseño estadístico calcula, en primer lugar cuatro varianzas diferentes:

- Varianza debida a desviaciones dentro de los calibrados (s_1^2):

$$s_1^2 = \frac{s_1}{nk-2k} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2}{nk-2k} \quad (21)$$

donde i es la posición que cada punto experimental ocupa dentro del calibrado, j la posición que ocupa cada calibrado dentro de los k totales, n el número de patrones e $\hat{y}_{i,j}$ el valor de y calculado a partir de las rectas individuales de cada calibrado.

- Varianza debida a diferencias entre las pendientes de los calibrados individuales (s_2^2):

$$s_2^2 = \frac{s_2}{k-1} = \frac{\sum_{j=1}^k (b_j - \bar{b})^2}{k-1} \quad (22)$$

donde \bar{b} es la media de las pendientes individuales y b_j las pendientes de los calibrados individuales, la cual se define a su vez como:

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x})(y_{i,j} - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x})^2} \quad (23)$$

siendo \bar{y} la señal media analítica total y \bar{x} tanto la concentración media de cada calibrado como la concentración media total, ya que ambas coinciden. Así, el hecho de calcular b_j implica que se supone que las observaciones pertenecen a k poblaciones distintas.

- Varianza debida a la desviación total sobre el calibrado global (s_T):

$$s_T^2 = \frac{s_T}{nk-2} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (y_{i,j} - \bar{y})^2 - b^0 \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x})(y_{i,j} - \bar{y})}{nk-2} \quad (24)$$

donde b^0 es la pendiente de calibrado global, la cual se calcula mediante la ecuación 25.

$$b^0 = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x})(y_{i,j} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x})} \quad (25)$$

Al calcular b^0 se supone, por tanto, que todas las observaciones pertenecen a la misma población.

- Varianza debida a desviaciones entre los calibrados individuales (s_3^2):

$$s_3^2 = \frac{S_3}{2k-2} = \frac{S_T - S_1 - S_2}{2k-2} \quad (26)$$

A continuación, se realiza el test estadístico de análisis de varianza, el cual consta de dos hipótesis:

- **Hipótesis 1:** no existen diferencias significativas entre los calibrados. Para confirmarla o rechazarla, se compara la relación de varianzas s_3^2/s_1^2 con el estadístico $F'_{(0,05, 2k-2, nk-2k)}$, de tal forma que si el valor experimental de F' es menor que el teórico, la desviación de los calibrados individuales sobre la recta de regresión global no es significativa. En consecuencia, no existen diferencias significativas entre los calibrados, y la calibración se corresponde con la recta de regresión global. Por el contrario, si el valor experimental de F' es mayor que el teórico, la desviación de los calibrados individuales sobre la recta de regresión es significativa, es decir, en este caso sí existen diferencias significativas entre los diferentes calibrados.
- **Hipótesis 2:** no existen diferencias significativas entre las pendientes de los calibrados individuales. En este caso, se compara la relación de varianzas s_2^2/s_1^2 con el estadístico $F''_{(0,05, k-1, nk-2k)}$. Si el valor experimental de F'' es menor que el teórico, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las

pendientes individuales. En el caso contrario, sí existen diferencias significativas y la recta de regresión global es inviable.

Tras el test estadístico pueden presentarse cuatro situaciones:

- Si las dos hipótesis anteriores se cumplen, las rectas son comparables entre sí, y el calibrado se obtiene mediante regresión global.
- Si se cumple la hipótesis 1 pero no la 2, existen diferencias significativas entre las pendientes de los calibrados individuales, por lo que nunca podrá aceptarse la validez de una recta global.
- Si se cumple la hipótesis 2 pero no la 1, la validez de la recta global también debe rechazarse ya que, aunque no existen diferencias significativas entre las pendientes individuales, las ordenadas en el origen sí son muy diferentes entre sí.
- Si no se cumple ninguna de las dos hipótesis, tanto las pendientes como las ordenadas en el origen de las rectas individuales son muy diferentes entre sí, y la viabilidad de una recta global de regresión queda tajantemente negada.

2.3. Calibración y regresión multivariantes

2.3.1. Introducción

Como ya se ha comentado anteriormente, los métodos de calibración tradicionales predicen la propiedad de interés utilizando un único método específico de medida, como por ejemplo la absorbancia a una cierta longitud de onda, o el máximo de fluorescencia a la longitud de onda del máximo de excitación. A estos métodos de calibración se les conoce como univariantes o de orden cero, y hacen uso de la siguiente ecuación de calibración:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x \quad (27)$$

donde \hat{y} es señal instrumental univariante, x la propiedad analítica de interés (generalmente, la concentración), y b_0 y b_1 los coeficientes de calibración. Durante la calibración, x es la variable conocida e y es la respuesta, y el modelo se denomina “directo” o “de avance”. Sin embargo, cuando se hace la predicción, el modelo se emplea a la inversa, es decir, se predicen los valores de \hat{x} a partir del modelo de calibración desarrollado (de los coeficientes b_0 y b_1) y de la propiedad analítica medida en la muestra problema (y) (véase la ecuación 28). Este modelo inverso se conoce también como “de retroceso”.

$$\hat{x} = -\frac{b_0}{b_1} + \frac{y}{b_1} \quad (28)$$

Si bien esta ecuación de predicción es efectiva en muchos casos, hace la peligrosa asunción de que la señal instrumental medida es específica o selectiva, es decir, que el analito siempre da la misma señal y a la misma concentración x , y que ningún otro constituyente de la muestra tiene influencia alguna sobre la medida de la señal. Estas condiciones no se cumplen siempre. De hecho, a no ser que las muestras se hayan purificado y estabilizado antes del análisis, existen interferencias (por ejemplo, constituyentes que dan lugar a señales analíticas similares) que pueden afectar a las medidas, de tal manera que éstas dejan de ser adecuadas para el desarrollo de la ecuación de predicción univariante. De ahí que tradicionalmente se hayan dedicado innumerables esfuerzos a los pasos previos al análisis propiamente dicho, preparando y purificando las muestras con el fin de conseguir que puedan medirse de forma específica o selectiva, es decir, que estén libres de interferencias.

El desarrollo de la instrumentación analítica ha permitido que actualmente sea posible obtener señales analíticas en función de dos o más variables (por ejemplo, el espectro completo de fluorescencia o la absorbancia a diferentes longitudes de onda) de manera rápida y sencilla. Los métodos de calibración multivariante (o de orden uno o superior) son capaces de predecir la propiedad analítica de interés a partir de la combinación de todas estas múltiples medidas instrumentales. Las principales ventajas

de estos métodos son la reducción del ruido instrumental y la consecución de la selectividad analítica mediante la eliminación ya no química, sino matemática de interferencias, puesto que se usa un mayor número de medidas de un mismo fenómeno. En consecuencia, el tratamiento de las muestras antes de la etapa de medida queda reducido drásticamente, lo cual implica tiempos de análisis más cortos. Además, estos métodos permiten la determinación de un analito en presencia de otros con características muy similares (por ejemplo, espectros de excitación y de emisión fluorescente muy solapados) y, por tanto, la resolución de mezclas complejas sin necesidad de etapas previas de separación.

2.3.2. Diseño del conjunto de estándares de calibración

Los métodos de calibración multivariante emplean un conjunto representativo de muestras de referencia, cada una de las cuales contiene concentraciones diferentes y conocidas de cada uno de los componentes de la mezcla en el intervalo seleccionado. La selección de este conjunto de muestras es crucial para que un modelo de calibración multivariante cumpla con éxito sus expectativas de predicción sobre muestras problema.

Dependiendo del número de componentes a determinar, existen varios procedimientos para diseñar la matriz de calibración. En cualquier caso, las concentraciones de los analitos en cada una de estas muestras deben seleccionarse de tal forma que barran de manera estadísticamente correcta todos los intervalos de concentraciones en los cuales se espera hallar las concentraciones de cada analito en las muestras problema. El modelo también debe recoger toda la información analítica referente a posibles interferencias, así como evitar la colinealidad, puesto que esto último complica el sistema de cálculo sin aportar información útil.

Para establecer los estándares de calibración, se recomienda en primer lugar escalar las variables del bloque de concentraciones entre -1 y +1, donde -1 representa el valor mínimo y +1 el valor máximo del intervalo. El escalado se realiza mediante la siguiente expresión (ecuación 29):

$$y'_{ij} = 2 \frac{y_{ij} - y_{\min,j}}{y_{\max,j} - y_{\min,j}} - 1 \quad (29)$$

donde $y_{\min,j}$ es el valor mínimo de la variable j , $y_{\max,j}$ su valor máximo, y'_{ij} el valor escalado e y_{ij} el correspondiente valor sin escalar. Para recuperar la escala natural, simplemente hay que despejar y_{ij} de la ecuación 29, tal y como expresa la ecuación 30:

$$y_{ij} = \frac{1}{2}(y'_{ij} + 1)(y_{\max,j} - y_{\min,j}) + y_{\min,j} \quad (30)$$

Diseñar los estándares de concentraciones sobre un espacio escalado tiene dos ventajas:

- En el espacio escalado, para un mismo número de variables y de estándares, se tiene siempre el mismo diseño, cualesquiera que sean las escalas naturales de las variables.
- El escalado enfatiza la variación de cada factor, independientemente de que su valor en la escala natural sea alto o bajo, o de que su intervalo natural de concentración sea amplio o estrecho, de tal forma que valores numéricos bajos o intervalos estrechos de variación, que pueden ser fundamentales, no pasan desapercibidos.

En general, los mejores resultados se obtienen estableciendo los estándares siguiendo los diseños de composición centrales de Box-Behnken o de Doehlert, los cuales constan de $2^p + I + p$ muestras patrón, siendo p el número de variables. Estas muestras patrón u “objetos” son de tres tipos:

- Las que contienen todas las combinaciones posibles de los niveles -0,7 y +0,7 (cosenos de 135° y 45°, respectivamente) del espacio escalado para todas las variables. Las combinaciones de estos puntos forman un “diseño factorial completo” a dos niveles, lo que supone un total de 2^p muestras. En el caso de dos componentes, estas muestras constituyen los

cuatro vértices (puntos del 1 al 4 en la figura 14 y la tabla 1) de un cuadrado inscrito en un círculo de radio 1, que a su vez está inscrito en un cuadrado exterior formado por las coordenadas -1 y +1. Si se tiene tres componentes, los objetos del diseño factorial completo forman los ocho vértices (puntos del 1 al 8 en la figura 15 y en la tabla 2) de un cubo inscrito en una esfera de radio 1 que a su vez está inscrita en un cubo exterior, formado por las coordenadas -1 y +1.

- El centro del círculo o de la esfera (puntos 5 y 15 en las figuras 14 y 15 y las tablas 1 y 2, respectivamente), cuyas coordenadas en el espacio escalado son todas cero). Por tanto, se trata de un solo objeto.
- Los objetos “estrella”, que se proyectan desde el centro en direcciones paralelas a las variables, hasta alcanzar el círculo a través de los lados del cuadrado interior (puntos del 6 al 9 en la figura 14 y en la tabla 1), o bien hasta alcanzar la superficie de la esfera a través de los centros de las caras del cubo interior (puntos del 9 al 14 en la figura 15 y en la tabla 2). Se añaden así otros 2p objetos al diseño.

Tabla 1. Diseño de composición central para dos variables.

Patrón	y'_1	y'_2
1	-0,7	-0,7
2	-0,7	0,7
3	0,7	-0,7
4	0,7	0,7
5	0	0
6	0	-1
7	0	1
8	-1	0
9	1	0

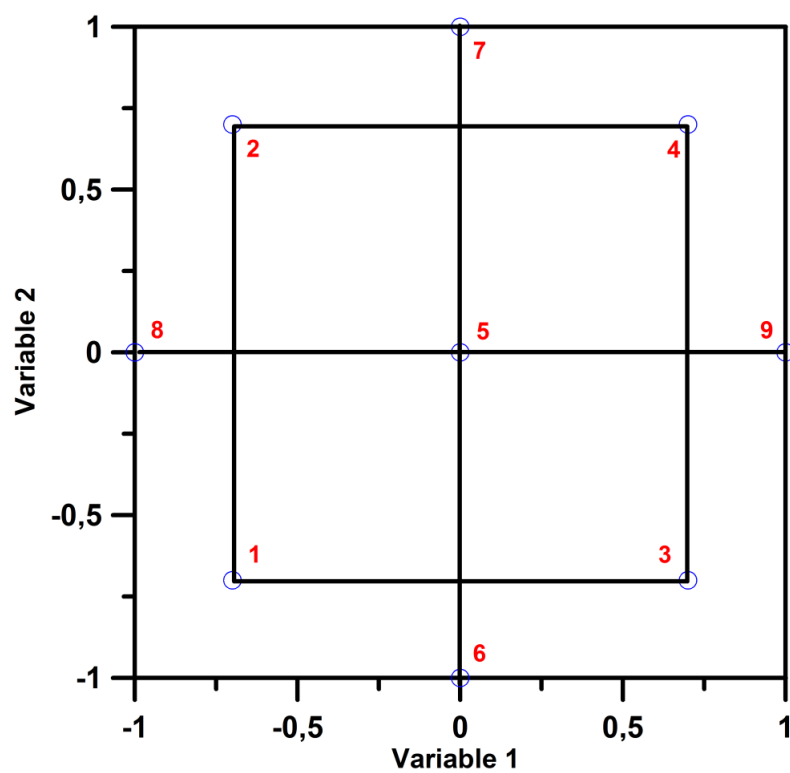


Figura 14. Diseño de composición central para dos variables.

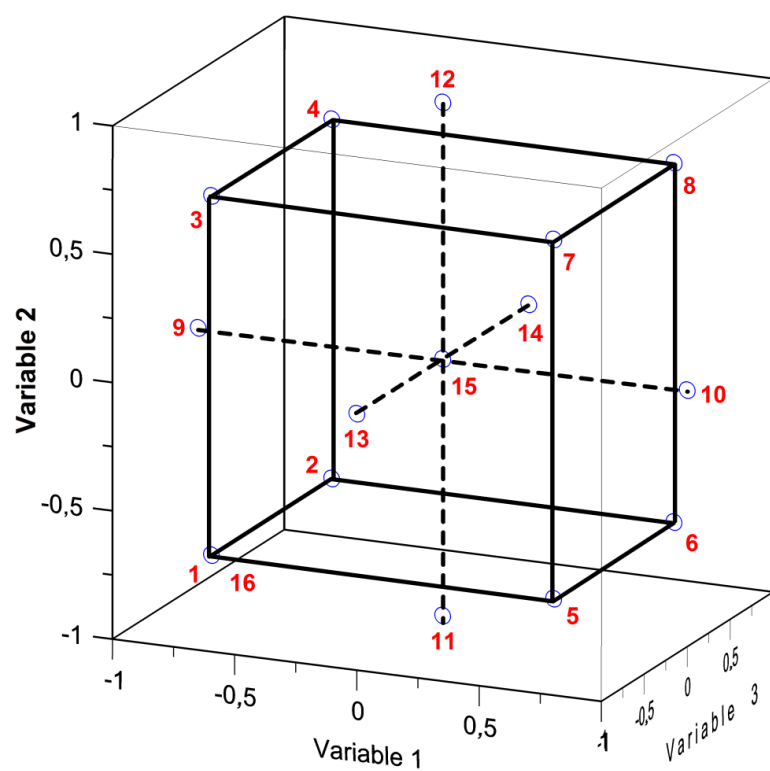


Figura 15. Diseño de composición central para tres variables.

Tabla 2. Diseño de composición central para tres variables.

Patrón	y'_1	y'_2	y'_3
1	-0,7	-0,7	-0,7
2	-0,7	-0,7	0,7
3	-0,7	0,7	-0,7
4	-0,7	0,7	0,7
5	0,7	-0,7	-0,7
6	0,7	-0,7	0,7
7	0,7	0,7	-0,7
8	0,7	0,7	0,7
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0

Siguiendo esta misma pauta, pueden añadirse patrones que ocupen posiciones intermedias entre las de los estándares de estos diseños básicos. Es asimismo recomendable incluir en el diseño de la matriz de calibración el blanco analítico.

2.3.3. Métodos de calibración multivariante

En calibración multivariante existen también modelos directos o de avance y modelos inversos o de retroceso, sin embargo el modelo es el mismo tanto para la calibración como para la predicción. Es decir, si, por ejemplo, la calibración se efectúa con un modelo directo, también se usará este modelo para la validación. La elección de uno u otro modelo depende de la complejidad del análisis, como se expondrá a continuación.

2.3.3.1 Modelos de avance. Mínimos cuadrados clásicos

El método más extendido para el caso de la calibración multivariante directa se conoce como “Mínimos Cuadrados Clásicos” (“Classical Least Squares”, CLS). Este modelo hace uso de una ampliación de la ecuación 27 de avance para el caso de tener varias variables instrumentales y componentes:

$$Y = XB + E \quad (31)$$

donde Y es la matriz de las señales instrumentales de los estándares, X es la matriz de las concentraciones, B es la matriz de los coeficientes de calibración y E la matriz de los errores espectrales o residuales no ajustados por el modelo. Cada componente de la mezcla está representado por el siguiente vector y , que no es más que una reducción de la ecuación 31:

$$y = Xb + e \quad (32)$$

Es decir, este modelo implica buscar en qué cantidad debe estar cada uno de los componentes en las muestras patrón para reproducir de forma matemática cada una de las señales instrumentales. Mediante el método de mínimos cuadrados, y siguiendo las reglas del álgebra matricial, puede llegarse a la ecuación 33, que permite calcular el vector b que minimiza las diferencias entre las señales instrumentales medidas (y) y las calculadas por el modelo (Xb):

$$b = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (33)$$

donde el superíndice T indica transposición matricial. Una vez se conocen los coeficientes del vector b , el modelo es capaz de predecir los valores de todas las magnitudes de interés (generalmente, las concentraciones de diferentes analitos en una muestra compleja).

Como puede verse, es un método muy sencillo. Sin embargo, no se trata del modelo de calibración multivariante más extendido debido a que sólo puede aplicarse si se cumplen tres condiciones:

- La respuesta instrumental es lineal con la concentración de los componentes de la muestra en el rango de concentraciones de trabajo.
- No existe interacción entre los componentes de la mezcla, de tal manera que las señales analíticas de las mezclas puedan reconstruirse a partir de las señales analíticas de los componentes puros.
- Se conoce perfectamente la composición cualitativa de la muestra, ya que, de lo contrario, se obtendrían errores muy importantes en la predicción de muestras problema. Este hecho restringe la aplicabilidad del método a mezclas de composición bien determinada (por ejemplo, fármacos), y elimina la posibilidad de utilizarlo con espectros de muestras naturales medidos directamente (gasolina, suelos, muestras biológicas...)

2.3.3.2. Modelos de retroceso

Los más extendidos son tres: la regresión lineal múltiple, la regresión por componentes principales y la regresión por mínimos cuadrados parciales.

2.3.3.2.1. *Regresión lineal múltiple*

A este modelo se le conoce también como “Mínimos cuadrados inversos” (“Inverse Least Squares”, ILS). Análogamente al modelo CLS, ILS se basa en la ampliación de la ecuación de retroceso (28) a todos los componentes y a todas las respuestas instrumentales, obteniéndose la ecuación 34:

$$X = YB + E \quad (34)$$

donde X es la matriz de las concentraciones, Y es la matriz de las señales instrumentales de los estándares, B es la matriz de los coeficientes de calibración y E la matriz de los errores espectrales o residuales no ajustados por el modelo. Asimismo, puede realizarse el análisis para cada componente empleando el sistema reducido dado por la ecuación 35:

$$x = Yb + e \quad (35)$$

Por mínimos cuadrados se puede obtener el vector de los coeficientes de calibración que minimizan las diferencias entre las concentraciones de los analitos presentes en los patrones y las concentraciones calculadas por el modelo:

$$b = (Y^T Y)^{-1} Y^T x \quad (36)$$

Como ya se comentó, una de las ventajas de los métodos de calibración multivariante es que permiten trabajar con un número elevado de señales instrumentales. Sin embargo, en este caso, a más señales instrumentales, más coeficientes de calibración aparecen en la matriz B , lo cual implica que debe registrarse un mayor número de más muestras de calibración. Por ello, para que el método sea operativo y los tiempos de análisis razonables, debe seleccionarse previamente un número restringido de señales instrumentales. Esta operación es crítica, porque:

- Si el número de señales seleccionado es demasiado pequeño, no se tiene en cuenta todas las fuentes de varianza significativas que influyen sobre las mismas, de tal forma que se obtienen modelos “subajustados”, los cuales se caracterizan por realizar predicciones afectadas por errores sistemáticos.

- Si el número de señales seleccionado es demasiado grande, el modelo tiene más parámetros de los estrictamente necesarios para representar todas las fuentes de varianza relevantes correlacionadas con la respuesta, y se dice que está “sobreajustado”. Las predicciones realizadas con un modelo sobreajustado tienen unos límites de confianza excesivamente grandes, como consecuencia de que el modelo incluye vectores que aportan información redundante, o sólo ruido, lo cual aumenta enormemente la incertidumbre de las predicciones.

La selección de las señales instrumentales puede basarse en conocimientos químicos (por ejemplo, en espectrofotometría es habitual elegir las longitudes de onda que corresponden a los máximos de absorción de cada componente de la mezcla) o en algoritmos matemáticos de optimización. Sin embargo, incluso en el mejor de los casos, las variables seleccionadas se encuentran como mínimo parcialmente correlacionadas entre sí, por lo que no se resuelve el problema de la redundancia.

En consecuencia, es más adecuado usar técnicas de calibración alternativas que sean capaces de solventar las dificultades que presenta el modelo ILS. Entre estas técnicas destacan el método de regresión por componentes principales y el método de regresión por mínimos cuadrados parciales. Estos dos modelos permiten trabajar con un conjunto amplio de señales instrumentales, ya que, previamente a la regresión, realizan una primera etapa de descomposición factorial, cuyo objetivo es obtener una representación simplificada de todos los datos experimentales sin perder nada de la información englobada en ellos y evitando al mismo tiempo la colinealidad.

2.3.3.2.2. *Regresión por componentes principales (PCR)*

El método utilizado en PCR para la descomposición factorial se conoce como “Análisis de componentes principales” (PCA), y el algoritmo más común para llevarlo a cabo es el “Non Linear Iterative Partial Least-Squares” (NIPALS). En principio, el fundamento de este método es sencillo: supóngase que el conjunto de respuestas

instrumentales son espectros de fluorescencia y que sobre él se aplica el método PCA. Como resultado, se obtiene un número mínimo de espectros matemáticos necesario para reconstruir, mediante combinaciones lineales (sumando cada espectro matemático multiplicado por cierto “factor de escala”), cada uno de los espectros de fluorescencia registrados. Concretamente, PCR consta de las siguientes etapas:

- En primer lugar, se calcula una respuesta instrumental media a partir de todo el conjunto de calibración utilizado. En el caso de haber medido, por ejemplo, espectros de fluorescencia, el método hace una media de todos los espectros de fluorescencia registrados.
- En segundo lugar, se crea un conjunto de respuestas instrumentales nuevas, las cuales son la diferencia entre cada una de las respuestas individuales del conjunto de calibración original y la respuesta instrumental media. Cada una de estas nuevas respuestas instrumentales se denomina vector director o “vector loading”. En el ejemplo anterior, se restaría a cada espectro de fluorescencia registrado el espectro de fluorescencia medio obtenido en el paso anterior, obteniéndose un nuevo conjunto de espectros de fluorescencia o “vectores loading” (los espectros matemáticos a los que antes se ha hecho referencia).
- Finalmente, se calcula la contribución de cada vector director a cada respuesta instrumental original. Estas contribuciones son los “factores de escala” o “scores”.

Así, como resultado de la aplicación del método PCA, cada respuesta instrumental puede reconstruirse a partir de un mismo número de “loadings”, diferenciándose unas de otras en los “scores”. Es decir, el método PCA aprovecha la multicolinealidad existente entre las variables del conjunto de respuestas instrumentales registradas para reemplazarlas por un número mucho menor de variables independientes entre sí (los “scores”), lo cual reduce enormemente la complejidad de los datos analíticos. A estas variables a veces se las conoce como “latentes”, para indicar que no se han medido directamente, sino que han sido calculadas a partir de combinaciones

lineales de las variables originales. Los “loadings” y los “scores” son los llamados “componentes principales”.

Matemáticamente, el método PCA supone una descomposición de la matriz Y de la ecuación 34 en una suma de n matrices, de tal forma que cada una de ellas se puede escribir como producto de un “vector score” (s) y un “vector loading” (\mathbf{l}), dando lugar a la “matriz de los scores” (S) y la “matriz de los loadings” (L) y, por tanto:

$$Y = S \cdot L + E \quad (37)$$

Como resultado, la matriz Y queda expresada en un nuevo sistema ortogonal de variables, en el cual los “scores” representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema (por ejemplo, las concentraciones), y los “loadings” los cosenos directores de los nuevos ejes con respecto a los anteriores (por ejemplo, los espectros de fluorescencia registrados).

Una vez llevada a cabo la calibración, tiene lugar la predicción de las concentraciones de los analitos en las muestras problema. Ésta tiene lugar mediante el registro de sus señales analíticas y el cálculo de los “scores” para las mismas mediante la introducción de los datos el método de calibración PCR desarrollado.

2.3.3.2.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

En PLS, el método para la descomposición factorial se asemeja mucho al método PCA. Sin embargo, la descomposición no sólo tiene lugar sobre la matriz de señales registradas, como en PCR, sino también sobre la matriz de concentraciones, contribuyendo en mayor proporción los espectros que corresponden a mayores concentraciones.

De entre todos los algoritmos existentes para la regresión PLS, el más usado (y también el empleado en los trabajos experimentales que se incluyen en esta Memoria) es el conocido como **PLS-1**, el cual calibra, predice y estudia estadísticamente de forma

individual cada uno de los componentes de la muestra. Como el pretratamiento de datos se hace en este caso tanto sobre la matriz de las señales como sobre la matriz de las concentraciones, se obtiene como resultado dos ecuaciones de calibración, cada una con sus matrices de “scores”, “loadings” y errores asociadas:

$$Y = S_Y \cdot L_Y + E_Y \quad (38)$$

$$X = S_X \cdot L_X + E_X \quad (39)$$

La predicción de las concentraciones de muestras problema implica la estimación de sus “scores” de señal analítica y de concentración mediante el modelo de calibración PLS obtenido en la etapa de calibración.

Además del PLS-1, existen varios algoritmos más para PLS, de entre los cuales destacan los tres siguientes:

- **PLS-2:** se trata de un algoritmo PLS global de calibración, de tal forma que permite realizar la descomposición y regresión de forma conjunta para todos los componentes, y no uno a uno, como en el caso del PLS-1. Considerando la potencia de los ordenadores actuales, la aplicación del algoritmo PLS-2 no presenta, en general, ventajas respecto al PLS-1.
- **n-PLS:** este algoritmo es necesario en el caso de emplear para la calibración variables de segundo orden (como, por ejemplo, espectros de fluorescencia total), o superior, de tal manera que cada una de estas variables ya no es un vector, sino una matriz. El procedimiento a seguir es similar al PLS-1, pero el tratamiento matemático es más complejo, y no será explicado aquí, puesto que no responde al objeto de la presente Memoria.
- **u-PLS:** necesario también en el caso de tener variables de segundo orden. Sin embargo, a diferencia del n-PLS, los datos se tratan matemáticamente para obtener una matriz de primer orden en un proceso conocido como

desdoblamiento (la “u” del método significa “unfolded”, es decir, “desdoblado”).

2.3.4. *Parámetros estadísticos de calidad*

A continuación se recogen las expresiones matemáticas utilizadas en el cálculo de los parámetros estadísticos de calidad más comunes en calibración multivariante:

- **PRESS** (“Prediction Residual Error Sum of Squares” o “Suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados”):

$$PRESS = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^l (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (40)$$

donde m indica el número de componentes, l es el número de muestras empleadas en la calibración, \hat{c}_i es la concentración estimada o calculada de cada analito y c_i es la concentración teórica o de referencia de cada analito. El PRESS es una medida de la calidad del ajuste de los datos de la matriz de calibración mediante el modelo de regresión utilizado.

- **RMSECV** (“Root Mean Square Error of Cross Validation” o “Error cuadrado medio de la validación cruzada”):

$$RMSECV = \sqrt{\sum_{i=1}^m \frac{(\hat{c}_i - c_i)^2}{m}} \quad (41)$$

- **SEP** (“Standard Error of Prediction” o “Error estándar de predicción”):

$$SEP = \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^l \frac{(\hat{c}_i - c_i)^2}{m}} = \sqrt{\frac{PRESS}{m}} \quad (42)$$

El SEP indica la desviación estándar de los errores medios de predicción.

- **RMSD** (“Residual Mean Standard Deviation” o “Desviación Estándar Media Residual”):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2} \quad (43)$$

El RMSD indica el error medio cometido en el análisis.

- **R²** (“Coeficiente de correlación múltiple”):

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^m (c_i - \bar{c})^2} \quad (44)$$

donde \bar{c} es el valor medio de las concentraciones teóricas. R^2 indica el grado de ajuste entre las concentraciones estimadas por el modelo y las reales y debe encontrarse lo más próximo posible a la unidad.

- **REP** (“Relative Error of Prediction” o “Error Relativo de Predicción”):

$$REP(\%) = \frac{100}{\bar{c}} \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2} \quad (45)$$

Se trata del porcentaje medio de los errores en la serie de las m muestras, y da una idea de la habilidad predictiva del método.

- **Gráfico de regresión entre las concentraciones estimadas y las reales:** es una buena herramienta para identificar posibles errores sistemáticos en el análisis. En el eje de abscisas se sitúan las concentraciones reales (que se consideran libres de error) y en el eje de ordenadas las calculadas. Generalmente, se utiliza el método de regresión lineal por mínimos cuadrados para ajustar los datos a líneas rectas, aunque pueden usarse otros, como el de mínimos cuadrados ponderados o el de mínima mediana de cuadrados.

Si el modelo es capaz de predecir correctamente muestras problema y no hay errores sistemáticos, la línea recta de ajuste debe tener pendiente uno y ordenada en el origen cero. En presencia de errores sistemáticos proporcionales, la ordenada en el origen sería cero pero la pendiente no sería uno, y en el caso de errores sistemáticos constantes, la pendiente sería uno, pero la ordenada en el origen no sería cero. La figura 16 ilustra los tres casos.

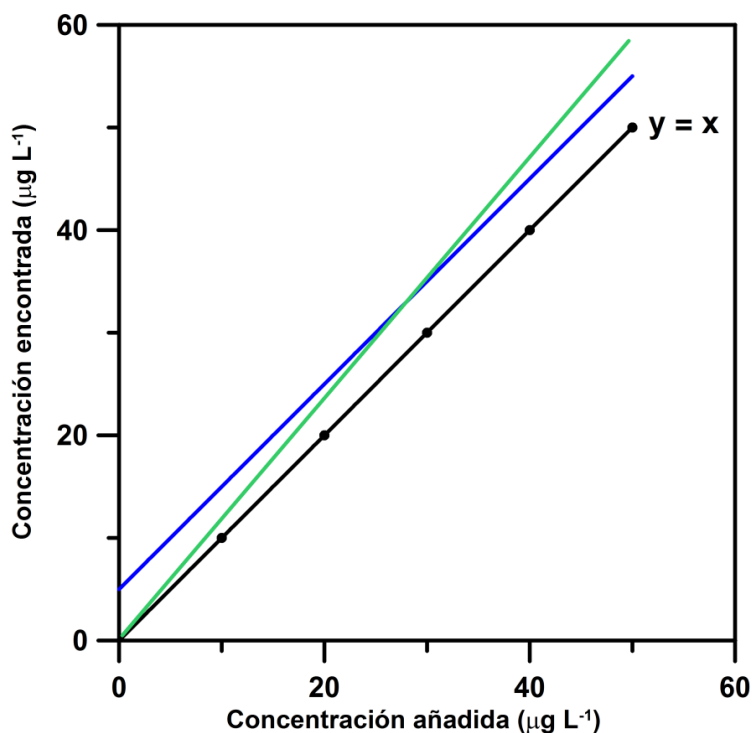


Figura 16. Gráfico de regresión entre las concentraciones encontradas y las concentraciones añadidas para la validación de un método de calibración multivariante. Se representan la recta teórica que se debería obtener (negro), una recta obtenida en presencia de errores sistemáticos proporcionales (verde) y una obtenida en presencia de errores sistemáticos constantes (azul).

Aun en ausencia de errores sistemáticos, los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de este gráfico de regresión nunca serán exactamente uno y cero, respectivamente. Este hecho se debe a la presencia de errores aleatorios, de tal forma que para aceptar el método es necesario dilucidar si los valores de pendiente y ordenada en el origen obtenidos son significativamente distintos de los valores teóricos o no. El estudio se lleva a cabo mediante la construcción de

la región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen, cuya forma es elíptica (véase la figura 17). Si el punto de pendiente unidad y ordenada en el origen cero está contenido dentro de la región delimitada por la elipse, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones reales y las predichas para un nivel de confianza elegido (generalmente, un 95%), es decir, cada miembro de un par de concentraciones puede considerarse como igual al otro miembro. Si, por el contrario, el punto $(1,0)$ está situado fuera de la elipse, se concluye que, para el nivel de confianza escogido, existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones predichas y las reales. Si este es el caso, quizás podría realizarse una segunda evaluación a un nivel de confianza menos exigente.

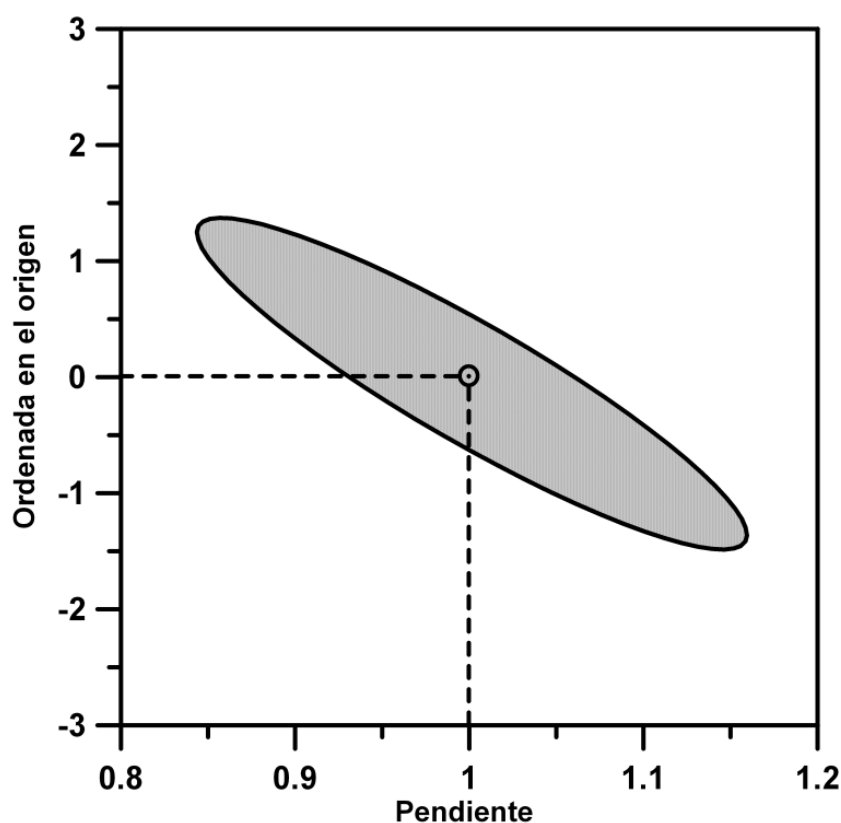


Figura 18. Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen. Se muestra también el punto ideal $(1,0)$.

2.3.5. Selección del número óptimo de factores

Anteriormente se ha comentado que modelos de calibración multivariante como PCR o PLS permiten reducir enormemente el número de variables experimentales y eliminar en gran medida errores aleatorios mediante la reducción de los datos a unas pocas variables latentes, conocidas como “loadings” y “scores”. La selección del número óptimo de “loadings” (conocidos también como “factores”) tiene una importancia capital en el análisis, por lo que dicho número debe ser siempre el que garantice la correcta resolución del problema analítico. Si se emplea un número de factores inferior al óptimo, se obtendrá un empobrecimiento de las predicciones; si el número de factores es superior al requerido, se produciría un sobreajuste, puesto que el ruido del sistema se estaría considerando también como señal analítica. En cualquiera de los dos casos, los resultados obtenidos serían muy pobres.

Para la determinación del número óptimo de factores pueden utilizarse diferentes criterios estadísticos. En la bibliografía especializada [238] se recomienda el uso del PRESS, que, como ya se ha comentado, es una medida de la bondad de la matriz de calibración para la determinación de la concentración de los analitos a un cierto número de factores. El PRESS se calcula mediante el método conocido como “validación cruzada”, el cual consta de los siguientes pasos:

- Se realiza la descomposición factorial de todos los patrones del conjunto de calibración excepto de alguno de ellos (normalmente sólo uno) para un factor. Se calcula la matriz de calibración por regresión.
- Con dicha matriz se estima la concentración de la muestra dejada fuera en el calibrado.
- Se calcula la diferencia entre la concentración predicha y la concentración teórica.
- Los tres pasos anteriores se repiten hasta haber efectuado todas las combinaciones posibles que dejen fuera el número de muestras de calibrado que

se estipuló. Como normalmente sólo se deja fuera una, el proceso suele repetirse tantas veces como patrones tenga la matriz de calibración.

- Con las diferencias entre concentraciones predichas y teóricas se puede calcular el valor del PRESS para un factor mediante la ecuación 40.
- Todo el proceso se repite tantas veces como número de factores para los cuales se quiere calcular el PRESS.

En principio, el número de factores óptimo debería ser aquél que proporcione el mínimo valor de PRESS, ya que es entonces cuando el sumatorio de las diferencias entre las concentraciones reales y las calculadas se hace mínimo. Sin embargo, en ocasiones se obtiene un número de factores mayor del necesario al aplicar el criterio anterior, lo cual conduce a modelos sobreajustados.

Haaland y Thomas propusieron en 1988 [238] una interesante corrección sobre este criterio con el fin de solventar la dificultad señalada anteriormente. El criterio de estos autores, que viene descrito por la ecuación 46, hace uso del parámetro estadístico F_h , que se utiliza para averiguar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre dos series de datos:

$$F_h = \frac{PRESS(h)}{PRESS(h^*)} \quad (46)$$

En la ecuación anterior, h^* es el número de factores para el cual se obtiene el mínimo PRESS y h es un número de factores inferior a h^* ($h = 1, 2, 3 \dots h^*$), de tal forma que mediante esta ecuación puede verse si existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones calculadas con h^* factores y las calculadas con un número de factores inferior a este número. El número de factores seleccionado como óptimo es el menor h que cumple la ecuación 47:

$$F_h < F_{\alpha, m} \quad (47)$$

donde $F_{\alpha,m}$ es el percentil $1-\alpha$ de la distribución F de Snedecor, siendo los grados de libertad (m) iguales al número de muestras estándar de calibración. La elección del valor α es fundamental, ya que valores muy altos producen sobreajustes y valores muy bajos falta de ajuste. En la publicación indicada anteriormente, Haaland y Thomas demostraron empíricamente que un valor de 0,25 para α es una buena elección como criterio de significación. En consecuencia, establecieron que el número óptimo de factores es el menor número al cual corresponda un PRESS cuya probabilidad (P) para la razón F sea inferior a 0,75.

En general, el número de factores calculado mediante este criterio suele corresponderse con el número de componentes que hay en la muestra. Sin embargo, en algunos casos ambos números no coinciden, y no es fácil determinar si los factores están relacionados con los componentes de la mezcla (no sólo sus concentraciones, sino también interacciones entre los diferentes analitos que afecten a sus concentraciones) o con variables de tipo instrumental (como la deriva de la línea base o cambios en el comportamiento de la respuesta del detector o en la fuente de radiación a lo largo del tiempo).

2.3.6. Detección de puntos discrepantes (“outliers”)

Haaland y Thomas también propusieron en 1988 [239] un método basado en la razón F para determinar muestras discrepantes, tanto en la etapa de calibración como en la de validación. En la calibración, las muestras discrepantes pueden detectarse bien usando la razón F de las concentraciones, bien usando la de las señales analíticas, mientras que en la validación la detección solamente puede llevarse a cabo mediante la razón F de las señales analíticas, ya que las concentraciones de las muestras son desconocidas.

- Muestras discrepantes en la calibración: La razón F de las concentraciones para cada muestra se calcula utilizando la ecuación 48.

$$F_{1,m-1}(c_j) = \frac{(m-1)(e_{c_j}^2)}{(\sum_{i \neq j} e_{c_i}^2)} \quad (48)$$

donde los subíndices de $F(c_j)$ indican los grados de libertad y e_{c_i} es la diferencia entre la concentración teórica y la estimada para cada muestra dejada fuera durante la validación cruzada.

Por otra parte, la razón F de las señales analíticas para cada muestra dejada fuera durante la validación cruzada es:

$$F_{x,y}(a_j) = \frac{(m-1)(\sum_{k=1}^n e_{a_{jk}}^2)}{(\sum_{i \neq j} \sum_{k=1}^n e_{a_{ik}}^2)} \quad (49)$$

donde a_j representa la señal analítica de la muestra que se deja fuera durante la validación cruzada, los subíndices de $F(a_j)$ indican los grados de libertad y n es el número de puntos incluido en el análisis.

- Muestras discrepantes en la validación: la ecuación de la razón F de las señales analíticas para cada muestra dejada fuera durante la validación cruzada (ecuación 50) es muy similar a la correspondiente a las muestras de calibración (ecuación 49).

$$F_{x,y}(a_s) = \frac{m(\sum_{k=1}^n e_{a_{sk}}^2)}{(\sum_{i=1}^m \sum_{k=1}^n e_{a_{ik}}^2)} \quad (50)$$

En la ecuación 50, a_s representa la señal analítica de la muestra desconocida que se deja fuera durante la validación cruzada, los subíndices de $F(a_s)$ indican los grados de libertad y n es el número de puntos incluido en el análisis.

En su publicación, Haaland y Thomas establecen que las muestras con una razón de F superior a la unidad son muestras anómalas que deben eliminarse de la matriz de calibración. Este criterio es de gran utilidad, especialmente en aquellos casos en los que

los métodos de calibración multivariante se aplican a un elevado número de muestras, como en el caso del control de calidad, puesto que resulta mucho más sencillo aplicar dicho criterio que analizar los residuales de todas las señales analíticas individuales.

2.4. Cálculo del límite de detección

El límite de detección (LD) se define como el nivel de concentración de analito más bajo que proporciona en el instrumento una señal estadísticamente diferente a la señal de un blanco analítico. Por ello, para calcular el límite de detección, es imprescindible definir en primer lugar qué señal es “estadísticamente diferente a la del blanco”.

El criterio más utilizado para métodos de calibración univariante es el recomendado por la IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”) en 1978 [240], según el cual el límite de detección es aquella concentración de analito que proporciona una señal neta igual a tres veces la desviación estándar del blanco, tal y como indica la ecuación 51:

$$LD = \frac{3s_B}{b} \quad (51)$$

donde s_B es la desviación estándar del blanco, b la pendiente de la recta de calibrado y 3 un factor de seguridad. Con este factor de seguridad, existe sólo un 0,13% de probabilidades de cometer un error de tipo α o falso positivo, es decir, asumir la presencia del analito cuando en realidad no se encuentra presente. Sin embargo, la probabilidad de cometer un error de tipo β o falso negativo (descartar la presencia del analito en casos en los que éste sí está presente) es del 50%. Para reducir también los errores de tipo β a un 0,13%, Kaiser propuso en 1970 [241] un factor de seguridad de 6.

Por su parte, Long y Winefordner indicaron en 1983 [242] que la definición de la IUPAC, con un factor de seguridad de 3, es, en general, suficiente para determinar el límite de detección. Sin embargo, demostraron que este criterio sólo es válido si la

mayor fuente del error se debe al blanco, y no al cálculo de la recta de calibrado. A fin de solventar esta dificultad, utilizaron la teoría de propagación de errores para proponer un nuevo criterio para calcular el límite de detección (ecuación 52) que no sólo incluyera la desviación estándar de las medidas del blanco, sino también los errores asociados a la pendiente y a la ordenada en el origen de la recta de calibrado.

$$LD = \frac{k}{b} \sqrt{s_B^2 + s_a^2 + \left(\frac{y_B - a}{b}\right)^2 s_b^2} \quad (52)$$

donde k es el factor de seguridad, y_B es el valor medio de la señal del blanco, y s_a y s_b son las desviaciones estándar debidas a la ordenada en el origen y a la pendiente, respectivamente. Puede comprobarse fácilmente que, si estas últimas son despreciables con respecto a s_B y si se utiliza un factor de seguridad de 3, la ecuación de Long y Winefordner (ecuación 52) se reduce a la recomendada por la IUPAC (ecuación 51).

Clayton y col. propusieron en 1987 una nueva definición del límite de detección [243]. El criterio de estos autores (ecuación 53) considera un factor de seguridad Δ no centrado y con $n-2$ grados de libertad, a fin de igualar las probabilidades de falsos positivos y falsos negativos.

$$LD = \frac{\Delta}{b} \sqrt{s_B^2 + s_a^2 + \left(\frac{y_B - a}{b}\right)^2 s_b^2} \quad (53)$$

En cuanto al cálculo del límite de detección de técnicas que hacen uso de calibración multivariante, en bibliografía puede encontrarse un gran número de métodos propuestos [244-246], si bien aún no existe ninguno estandarizado. En los trabajos presentados en esta Tesis se propone un sencillo método, desarrollado por nuestro grupo de investigación, para calcular el límite de detección de un método que hace uso de calibración multivariante. Nuestro criterio se basa en la ecuación recomendada por la IUPAC (ecuación 51) y utiliza un factor de seguridad de 3 y como b la pendiente del gráfico obtenido durante la etapa de validación del método al ajustar a una recta los

datos de las concentraciones estimadas por el modelo multivariante frente a las concentraciones adicionadas. Evidentemente, la pendiente de dicha recta está siempre muy próxima a la unidad, si no hay errores. Sin embargo, siempre que los replicados del blanco se predigan mediante la metodología PLS, la sensibilidad analítica y los errores estadísticos asociados a la ordenada en el origen se encuentran ya incluidos en la desviación estándar del blanco.

CAPÍTULO III

DISOLUCIONES, INSTRUMENTACIÓN Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

1. Reactivos y disoluciones

En la tabla 1 se muestran las disoluciones madre que se prepararon con cada uno de los analitos utilizados en la elaboración de esta Tesis. Se incluye, su concentración en la disolución, el medio en el que se prepararon y la casa comercial que los distribuye.

<i>Tabla 1. Disoluciones madre de los analitos.</i>			
Principio activo	Concentración	Medio	Casa comercial
Doxicilina (hiclato)	50,0 mg L ⁻¹	Acuoso	Sigma
Clortetraciclina (hidrocloruro)	50,0 mg L ⁻¹	Acuoso	Fluka
Ácido mefenámico	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Ácido flufenámico	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Fluka
Ácido tolfenámico	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Nabumetona	50,0 mg L ⁻¹	Etanol 96% v/v	Sigma
6-MNA¹	50,0 mg L ⁻¹	Etanol 96% v/v	Cayman Chemical Company
Ácido salicílico (sal sódica)	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Ácido gentísico	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Doxorubicina (hidrocloruro)	5,0·10 ⁻² mol L ⁻¹	Acuoso	Sigma
¹ Ácido 6-metoxi-2-naftilacético.			

Análogamente, la tabla 2 recoge las disoluciones madre que se prepararon de otros principios activos utilizados en estudios de interferencias.

Tabla 2. Disoluciones madre de otros principios activos empleados.

Principio activo	Concentración	Medio	Casa comercial
Ácido meclofenámico (sal sódica)	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Diclofenaco (sal sódica)	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Diflunisal	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Salicilamida	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma
Naproxeno	50,0 mg L ⁻¹	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Sigma

Las disoluciones de otros reactivos empleados pueden verse en la tabla 3.

Tabla 3. Disoluciones madre de otros reactivos utilizados.

Reactivo	Concentración	Medio	Uso	Casa comercial
Europio (III) (cloruro)	2·10 ⁻³ mol L ⁻¹	Acuoso	Sensibilizador	Aldrich
EDTA¹	2·10 ⁻³ mol L ⁻¹	Acuoso	Sensibilizador	Sigma-Aldrich
CTACl²	5% v/v	Acuoso	Sensibilizador	Fluka
Terbio (III) (cloruro)	2·10 ⁻² mol L ⁻¹	Acuoso	Sensibilizador	Aldrich
TOPO³	1·10 ⁻² mol L ⁻¹	Etanol 96%	Surfactante	Aldrich
Tritón X-100	1% v/v	Acuoso	Sensibilizador	Sigma
Ru(dpp)₃-PAN⁴	50 mg mL ⁻¹	Acuoso	Referencia interna	Preparado en el laboratorio
Etanol	96%	-	Disolvente	Panreac
Ácido clorhídrico	Varias	Acuoso	Proporcionar medio ácido	Panreac/Merck
Hidróxido Sódico	Varias	Acuoso	Proporcionar medio básico	Panreac/Merck

¹Ácido etilendiaminotetraacético.

²Cloruro de cetiltrimetilamonio.

³Óxido de trioctilfosfina.

⁴Nanopartículas de rutenio(II)tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)-Poliacrilonitrilo.

En cuanto a las disoluciones reguladoras, se utilizaron las indicadas en la tabla 4.

<i>Tabla 4. Disoluciones reguladoras.</i>				
Reactivos	Concentración	pH	Casa comercial	Capítulo
Dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato	2,0 mol L ⁻¹	8,2	Panreac	4
Tris¹	2,0 mol L ⁻¹	8,2	Panreac	4
Ácido carbónico/hidrogenocarbonato	1,0 mol L ⁻¹	6,0	Panreac	5
Dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato	1,0 mol L ⁻¹	6,6	Panreac	5
Ácido cítrico/citrato	1,0 mol L ⁻¹	6,0	Merck	5
Ácido acético/acetato	1,0 mol L ⁻¹	5,4	Panreac	5
Tris¹	2,0 mol L ⁻¹	8,0	Panreac	6
Ácido acético/acetato	2,0 mol L ⁻¹	5,5	Panreac	7
Ácido cítrico/citrato	0,5 mol L ⁻¹	3,0	Merck	8
¹ Tris(hidroximetil)aminometano.				

Por último, para las aplicaciones de los métodos propuestos se usaron disoluciones de los fármacos recogidos en la tabla 5.

<i>Tabla 5. Preparaciones farmacéuticas analizadas.</i>				
Nombre comercial	Casa comercial	Principio activo	Presentación	Concentración del pr. activo
Doxitén Enzimático	Teofarma	Doxiciclina (hiclato)	Cápsulas	100 mg por cápsula
Doxiciclina Normon	Genéricos Normon	Doxicilina (hiclato)	Grageas	100 mg por gragea
Oftalmolosa Cusí Aureomicina	Alcon Cusí	Clortetraciclina (clorhidrato)	Pomada	5 mg por gramo de pomada

Coslan	Parke-Davis	Ácido mefenámico	Cápsulas	250 mg por cápsula
Movilat Plus Gel	Laboratorio STADA	Ácido flufenámico	Pomada	3 g por cada 100 g de pomada
Relif	Meda Pharma	Nabumetona	Comprimidos	1 g por comprimido
Diprosalic	Farmacéutica Essex	Ácido salicílico	Pomada	30 mg por gramo de pomada
Callicida rojo	Laboratorio ESCANED	Ácido salicílico	Preparado líquido	12 g por cada 100 g de preparado
Antiverrugas ISDIN	ISDIN	Ácido salicílico	Preparado líquido	16,7 g por cada 100 mL de preparado

Por último, las muestras de orina utilizadas en esta Tesis se tomaron a primera hora de la mañana de personas sanas, en ayunas y que no tuvieran en su organismo ningún tipo de medicamento. Todas las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos con el fin de separar los sólidos en suspensión, tomándose a continuación la disolución sobrenadante para el análisis. Las muestras se conservaron en la oscuridad y a 4 °C.

2. Instrumentación

2.1. Espectrofluorímetro de barrido SLM Aminco Bowman Series 2

Este equipo permite realizar medidas tanto de fluorescencia como de fosforescencia en estado estacionario, así como medidas de tiempos de vida de fosforescencia. Además, con él pueden obtenerse espectros tridimensionales de manera sencilla y rápida. Sin embargo, en el desarrollo de la presente Tesis este equipo se utilizó únicamente para el registro de espectros bidimensionales de fluorescencia.

El SLM Aminco Bowman Series 2 está formado por los siguientes componentes:

- **Fuente de excitación:** el equipo cuenta con dos lámparas diferentes. El uso de una u otra depende de las medidas que se vaya a realizar. Así, para realizar medidas de fluorescencia debe seleccionarse la lámpara de arco de xenón de 150 W y para medidas de fosforescencia la lámpara pulsada (o “flash”) de xenón de 7 W. El espectrofluorímetro cuenta con una corrección del espectro de la lámpara a tiempo real. La relación señal-ruido para la banda Raman del agua a 350 nm de excitación y 397 nm de emisión es de 2000:1 RMS para la lámpara continua (apertura de las rendijas = 4 nm) y de 1000:1 RMS para la lámpara pulsada (apertura de las rendijas = 8 nm).
- **Sistema de selección de longitudes de onda:** el equipo incluye dos monocromadores Czerny-Turner, uno para la excitación y otro para la emisión, que permiten seleccionar longitudes de onda en incrementos de 0,2 nm, con una precisión de 0,5 nm y una repetibilidad de 0,25 nm. La distancia focal de los espejos es de 200 mm y las redes de difracción son holográficas cóncavas, de 1200 líneas/mm. Seleccionables a través de software son la velocidad de barrido (entre 3 y 6000 nm/min) y la apertura de las rendijas (entre 1 y 16 nm).
- **Sistema de detección:** está constituido por un fotomultiplicador que cubre el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 220 y 850 nm.

Este espectrofluorímetro está totalmente controlado por ordenador mediante el programa AB2, que opera en entorno Windows. Ordenador y equipo están acoplados a través de una interface GPIB de Nacional Instruments. Los espectros obtenidos deben exportarse en formato ASCII para poder trabajar posteriormente con ellos usando otros programas informáticos, como Excel o Grapher.



Figura 1. Espectrofluorómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2.

A la hora de trabajar con este equipo hay que tener en cuenta, y optimizar si fuera necesario, los siguientes parámetros instrumentales:

- **Voltaje del fotomultiplicador:** al aumentar el voltaje se aumenta la sensibilidad del sistema, lo cual implica la obtención de límites de detección más bajos. Sin embargo, el aumento del voltaje lleva también asociado el aumento del ruido instrumental. Así mismo, la disminución del voltaje permite medir concentraciones de analito mayores y, por tanto, la ampliación del rango dinámico de análisis.
- **Apertura de las rendijas:** un aumento en la anchura de las rendijas implica un aumento en la sensibilidad del análisis, pero también un aumento del ruido experimental.
- **Velocidad de registro de las medidas:** cuanto mayor es ésta, el tiempo de análisis es menor, pero el ruido instrumental aumenta enormemente.

2.2. Espectrofluorímetro de barrido Photon Technology International (PTI) Time Master

Este espectrofluorímetro permite, al igual que el anterior, el registro de espectros de fluorescencia y de fosforescencia, tanto en dos como en tres dimensiones. Sin embargo, a diferencia del SLM Aminco Bowman Series 2, no sólo permite realizar medidas de decaimiento fosforescente, sino también medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo.

El equipo PTI es un sistema modular que consta de las siguientes partes:

- **Fuente de excitación:** tres fuentes de excitación diferentes pueden seleccionarse: la primera es una lámpara continua de arco de xenón de 75 W (para medidas de fluorescencia en estado estacionario); la segunda, una lámpara pulsada (o “flash”) de xenón (para medidas de fosforescencia); y la tercera, un láser pulsado de nitrógeno con un ancho de pulso de 800 ps (para medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo). Para el Raman del agua, la sensibilidad de la lámpara continua es 10000:1 RMS (apertura de las rendijas = 5 nm) y la de la lámpara de flash, 3000:1 RMS (apertura de las rendijas = 10 nm). Con el láser de nitrógeno puede medirse el decaimiento de una disolución de fluoresceína 7 pmol L^{-1} .
- **Sistema de selección de longitudes de onda:** para las dos lámparas de xenón, el equipo cuenta con tres monocromadores Czerny-Turner, uno para la excitación y dos para la emisión, que permiten seleccionar longitudes de onda en incrementos de 0,25 nm, con una precisión de 1,0 nm y una resolución de 0,5 nm. La distancia focal de los espejos es de 200 mm, y las redes de difracción son holográficas cóncavas, de 1200 líneas/mm. El software que controla el equipo permite variar tanto la apertura de las rendijas (entre 0 y 26 nm) como la separación entre los puntos registrados (entre 0,25 y 100 nm/min). Este último parámetro está directamente relacionado con la resolución de los espectros y el tiempo necesario para su registro.

El láser de nitrógeno emite luz a 337 nm. Sin embargo, mediante un sistema que utiliza un módulo con diferentes colorantes y un doblador de frecuencias, se puede seleccionar longitudes de onda de excitación comprendidas entre 235 y 990 nm.

- **Sistema de detección:** este espectrofluorímetro viene equipado con tres fotomultiplicadores diferentes. El primero, capaz de operar tanto en modo analógico como digital, detecta y mide fluorescencia entre 200 y 700 nm. El segundo fotomultiplicador es análogo al primero, pero se halla sincronizado con la frecuencia de pulso de la lámpara pulsada, de tal forma que permite trabajar en fosforescencia. El tercero es específico para trabajar en modo estroboscopio, y permite llevar a cabo medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo.



Figura 2. Espectrofluorímetro de barrido Photon Technology International Time Master.

Las distintas fuentes de radiación, así como los sistemas de detección se encuentran situados en forma de cruz con respecto al compartimento de la muestra, el cual cuenta con dos entradas y salidas enfrentadas, tal y como puede observarse en la figura 3.

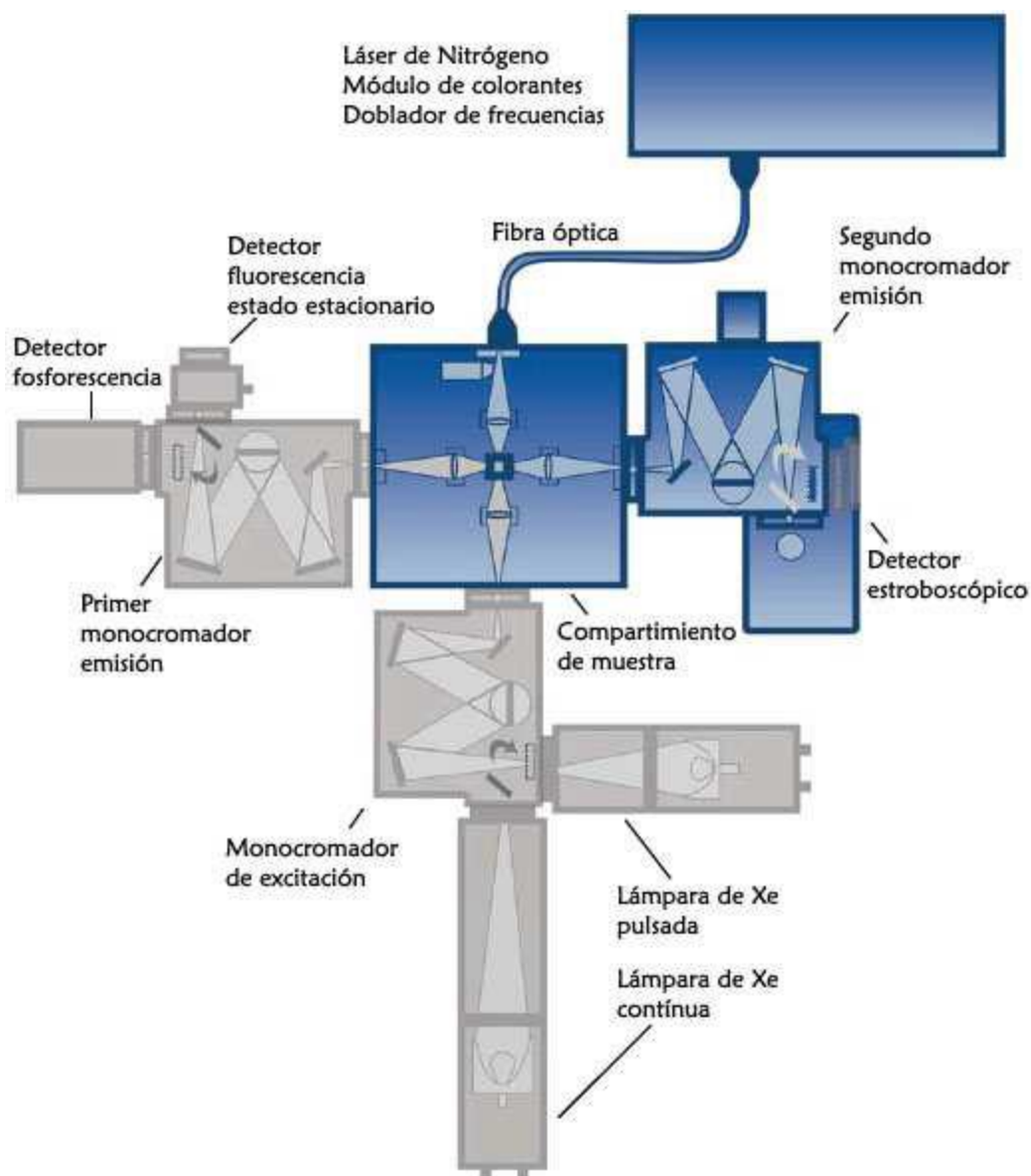


Figura 3. Esquema del espectrofluorímetro de barrido
Photon Technology International Time Master.

El portacubetas se halla termostatzado gracias a la circulación por su interior de un líquido refrigerante impulsado por un baño termostático Selecta modelo Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre 0 y 99 °C con una precisión de 0,1 °C.

Un ordenador controla el equipo a través de una interfaz Ethernet. El software, denominado Felix32, es mucho más avanzado que el AB2; es capaz, por ejemplo, de efectuar todo tipo de operaciones matemáticas con espectros bidimensionales, de representar espectros tridimensionales (de excitación/emisión o resueltos en el tiempo) o de calcular tiempos de vida con deconvolución de la señal de la fuente de excitación. Además, la exportación de los datos de medida es mucho más cómoda, puesto que pueden copiarse directamente para ser pegados en cualquier programa de tratamiento de datos o escritura (como Excel, Word o Grapher).

Al trabajar con el PTI Time Master en modo digital no hay que prestar atención al control del voltaje, puesto que éste se mantiene automáticamente a un valor constante de 1000 V. Sin embargo, sí hay que tener en cuenta y, en su caso, optimizar otras variables de tipo instrumental:

- **Apertura de las rendijas:** al igual que en el Aminco, un aumento en la anchura de las rendijas implica un aumento en la sensibilidad del análisis, pero también un aumento del ruido experimental.
- **Tiempo de integración:** es el tiempo durante el cual el equipo mide la señal luminiscente. Evidentemente, un aumento del tiempo de integración alarga los análisis, pero también proporciona una mayor sensibilidad y un menor ruido instrumental.
- **Número de canales:** es el número de puntos que el equipo registra para cada medida. A más canales, mayor tiempo de registro, pero también mayor resolución.
- **Número de disparos:** es el número de veces que el equipo registra cada punto experimental. El software Felix32 procesa los datos y representa la media de las

medidas. Al aumentar el número de disparos aumenta el tiempo de registro, pero disminuye el ruido instrumental.

- **Frecuencia de disparos:** a mayor frecuencia, menor tiempo de análisis, pero también mayor ruido instrumental.
- **Número de medias** (o número de replicados): es el número de veces que el equipo registra la medida completa de la muestra. Al igual que ocurría con el número de disparos, al aumentar el número de replicados disminuye el ruido instrumental, en detrimento del tiempo de registro. Aunque, en general, es muy ventajoso registrar varios replicados de una misma medida, hay que tener en cuenta que este procedimiento no es adecuado para el análisis de moléculas que presenten fotodescomposición, puesto que su luminiscencia será cada vez menos intensa cuanto más tiempo se las esté irradiando.
- **Selección del modo de adquisición:** los datos pueden registrarse con el PTI Time Master de forma secuencial, aritmética y logarítmica, lo cual permite obtener una mayor densidad de puntos (y, por tanto, mayor información) en la zona de interés de un decaimiento.

2.3. Instrumentación para “Dual-Lifetime Referencing”

En el campo de frecuencias se utilizó para la adquisición de las señales analíticas el dispositivo de detección de fase PDD-470 de PreSens (Precision Sensing GmbH, Ratisbona, Alemania). Este dispositivo portátil, pequeño y ligero, cuenta con un LED que emite luz a 470 nm y un fotodiodo como detector. La luz procedente del LED, que está modulada en forma de seno a una frecuencia de 49 kHz, se enfoca hacia una fibra óptica bifurcada que se dirige hacia la muestra. La luz emitida por ésta se conduce hacia el detector a través de esta misma fibra óptica bifurcada. El PDD-470 envía a continuación la información a un ordenador. El software PhaseView (Ratisbona, Alemania) muestra gráficamente en pantalla y en tiempo real los datos de amplitud y desfase de la señal a intervalos de 1 segundo, y es capaz de almacenarlos simultáneamente en archivos de texto.

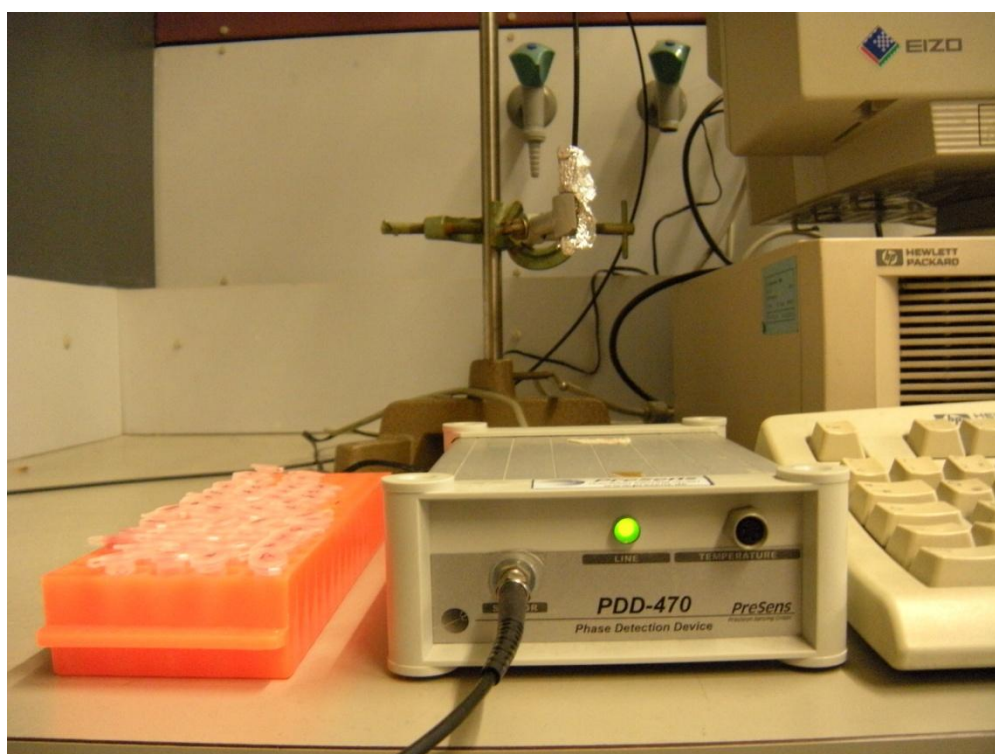


Figura 4. Dispositivo de detección de fase PDD-470 de PreSens.

Para medidas de DLR en el campo de tiempos, las muestras se introdujeron en una caja negra, con el fin de aislarlas de la luz exterior. La excitación de las mismas tuvo lugar gracias a la acción de un conjunto de LEDs (Luxeon V Star LXHL-LB5C 5 W; Lumileds Lighting Company) situado sobre ellas que emitía luz a 460 nm. La luminiscencia emitida por la muestra atraviesa un filtro de emisión de vidrio (OG530, Schott, 530 nm) y llega al detector, que es una cámara CCD con un chip de 12 bits (640x480 pixels) y una frecuencia de 400 Hz. Gracias al sistema incorporado ImageX Time Gated Imaging (TGI, Photonic Research Systems) y a su correspondiente software para Windows (ImageX) pueden obtenerse en el ordenador imágenes en dos dimensiones de la luminiscencia de la muestra. El software permite asimismo la integración y manipulación de las señales, de tal manera que es capaz de proporcionar directamente el valor de la relación R entre las señales luminiscentes a las dos ventanas de medida. Los parámetros a controlar son los distintos tiempos que determinan el análisis por DLR en el campo de tiempos (véase la figura B.7 del capítulo introductorio

de la presente Memoria), así como el tiempo de integración de las señales. Al igual que en el PTI, un aumento del tiempo de integración proporciona una mayor sensibilidad y un menor ruido instrumental, si bien hay que prestar atención para que la señal registrada no llegue a una situación de saturación instrumental.

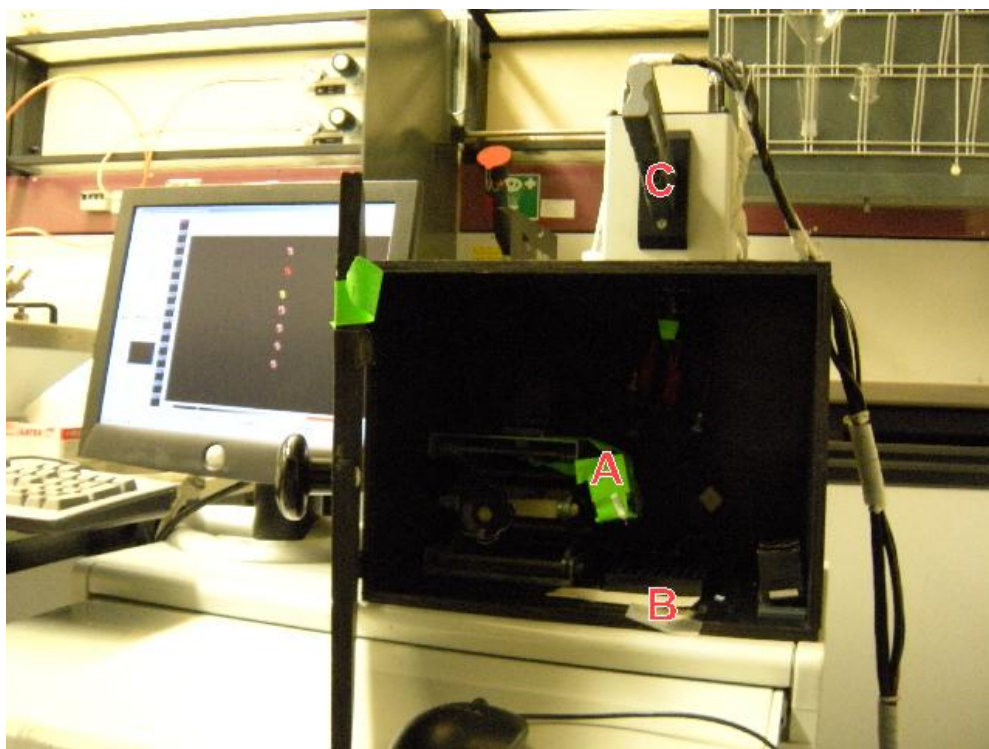


Figura 5. Instrumentación utilizada en DLR en el campo de tiempos. A es la fuente de emisión (LEDs), B es la muestra (en pozos de microplacas) y C es el detector (una cámara CCD).

2.4. Otros aparatos utilizados

- Para la pesada de los reactivos se usaron dos balanzas: un **granatario** Sartorius de sensibilidad 0,1 g y una **balanza analítica** Mettler modelo AE con una sensibilidad de 0,01 mg.
- Las disoluciones acuosas se prepararon utilizando agua destilada mediante un **sistema de purificación de agua** Milli-Q 185 plus. La concentración de materia orgánica en el agua procedente de este equipo es siempre inferior a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

- Las medidas de pH se llevaron a cabo en un **pH-metro** Crisol modelo 2001 que cuenta con un electrodo combinado de vidrio y calomelanos. La sensibilidad de este dispositivo es de 0,01 unidades de pH.
- La centrifugación de muestras de orina se efectuó en una **centrífuga** Selecta modelo Medifriger termostatizable, con una velocidad máxima de 5000 rpm.
- La disolución de reactivos de baja solubilidad se facilitó gracias a la acción de un **baño de ultrasonidos** Selecta modelo Ultrasons.

3. Programas informáticos

3.1. Software para la elaboración de gráficos

Para la representación de la gran mayoría de las figuras que pueden verse en la presente Memoria se utilizó el programa **Grapher**, en su versión 7.0.1870, desarrollado por Golden Software Inc. (Golden, Colorado, EE.UU.)

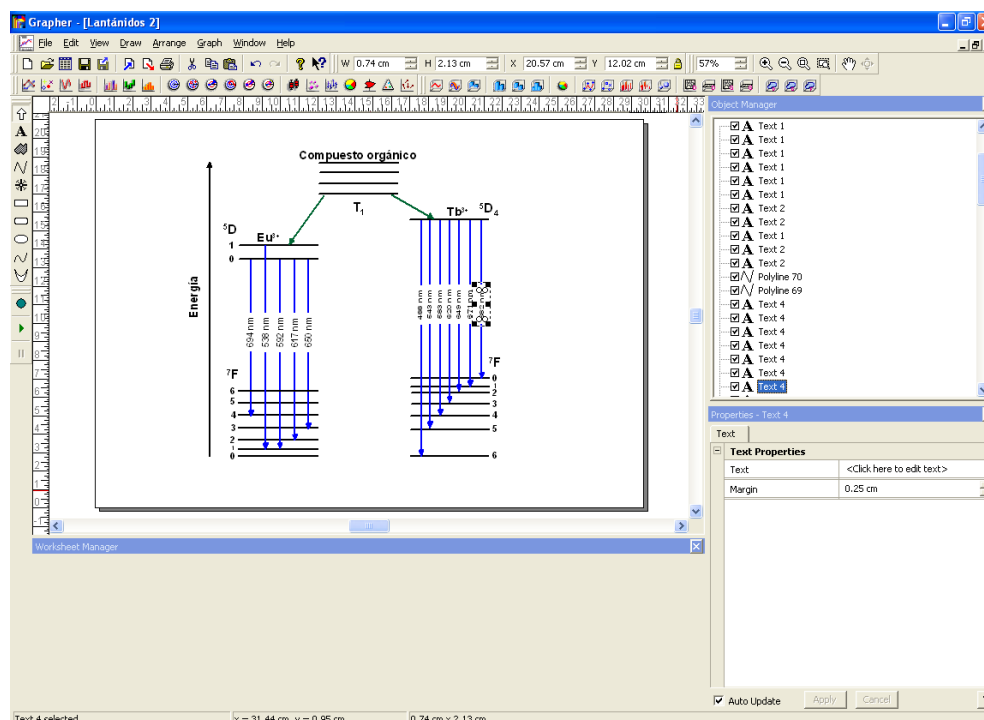


Figura 6. Captura de la ventana del programa Grapher 7.

3.2. Software para la representación de estructuras químicas

El programa utilizado en esta Memoria para la representación de estructuras moleculares es el **ChemBioOffice 2010**, diseñado por CambridgeSoft en el año 2010. Concretamente, se utilizaron dos subprogramas: ChemBioDraw Ultra 12.0 para la representación de moléculas en dos dimensiones, y Chem 3D Pro 12.0 para la representación de estructuras tridimensionales.

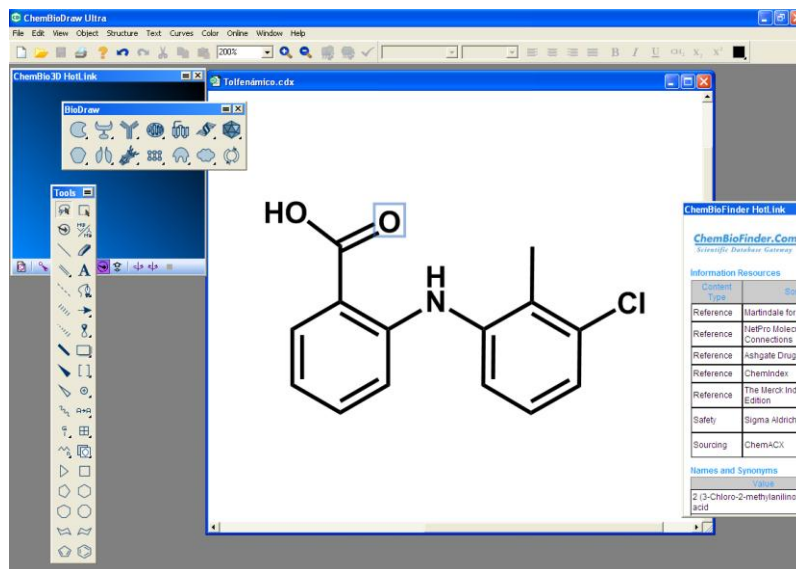


Figura 7. Captura de la ventana del subprograma ChemBioDraw Ultra 12.0.

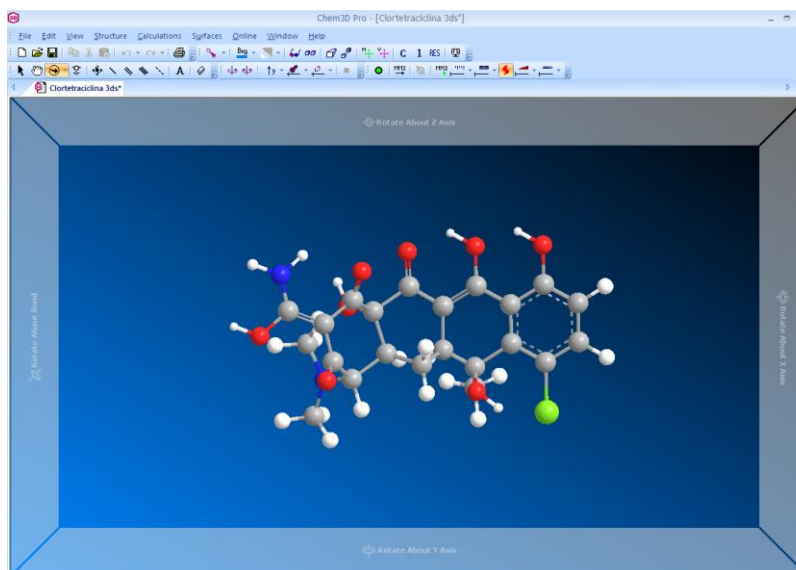


Figura 8. Captura de la ventana del subprograma Chem 3D Pro 12.0.

3.3. Ftotal para la representación de espectros tridimensionales

En varios capítulos de esta Tesis se registraron y representaron los espectros tridimensionales de excitación/emisión de los analitos con el fin de comprobar que en las mezclas de compuestos estudiadas el solapamiento es tan amplio que éstas no pueden resolverse mediante metodologías luminiscentes clásicas, justificándose así el uso de técnicas luminiscentes resueltas en el tiempo.

Los espectros tridimensionales se adquirieron con el PTI y los datos se exportaron posteriormente a archivos de Excel para representar los espectros utilizando el programa **FTOTAL** desarrollado por José Antonio Murillo Pulgarín y Aurelia Alañón Molina [5] en un entorno de Matlab (MathWorks), gracias a la colaboración de Ignacio Sánchez-Ferrer Robles. Para que el programa interprete correctamente los datos, es necesario, en primer lugar, que el número total de puntos experimentales sea exactamente 29341, por lo que se decidió registrar en cada caso 61 espectros de excitación con 481 puntos cada uno. En segundo lugar, es necesario que el espectro sea cuadrado, es decir, que el intervalo barrido en la excitación sea igual al intervalo cubierto en la emisión. Por ejemplo, en los trabajos de esta Tesis se decidió barrer unos intervalos de 288 nm. En este caso, la distancia de un punto al siguiente en cada espectro de excitación debe ser de 0,6 nm ($0,6 \text{ nm} \times 480 = 288 \text{ nm}$), y el incremento en la longitud de onda de emisión a la cual se registra cada espectro de excitación ha de ser de 4,8 nm ($4,8 \text{ nm} \times 60 = 288 \text{ nm}$).

Es imprescindible haber efectuado previamente estudios para conocer tanto la forma de los espectros bidimensionales como la localización de los máximos de excitación y de emisión de los analitos. De esta forma, se podrá elegir los intervalos de longitudes de onda más adecuados a fin de que los espectros tridimensionales obtenidos contengan la máxima información analítica posible. Asimismo, para minimizar el ruido instrumental y aumentar la sensibilidad es conveniente haber optimizado los parámetros instrumentales de los que dependen las medidas adquiridas con el equipo PTI.

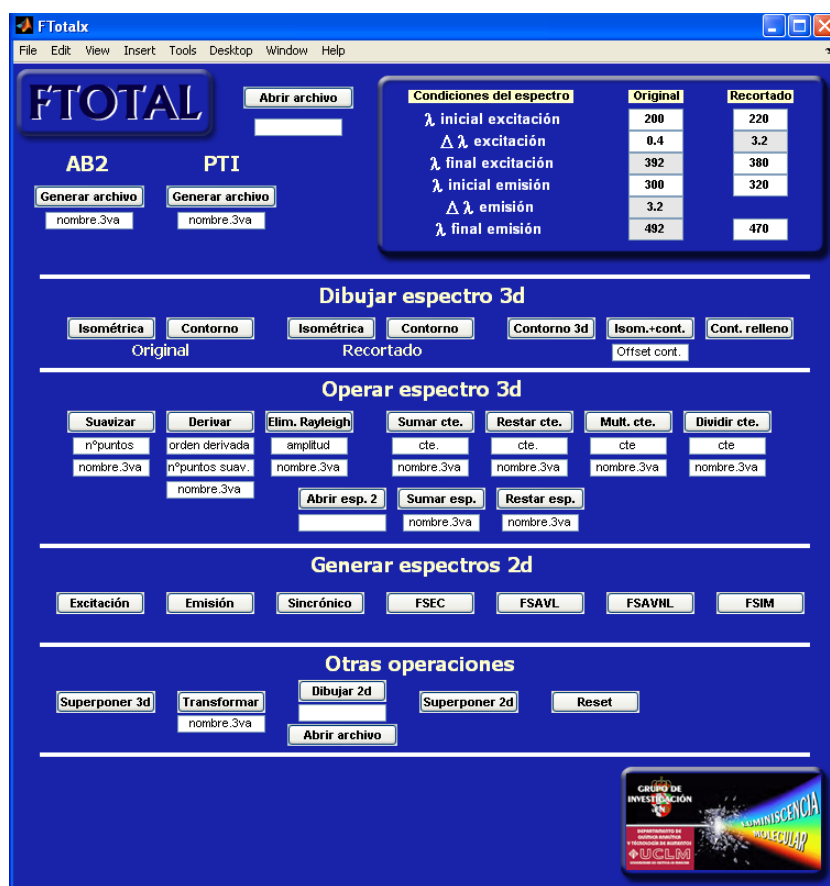


Figura 9. Captura de la pantalla principal del FTOTAL para Matlab.

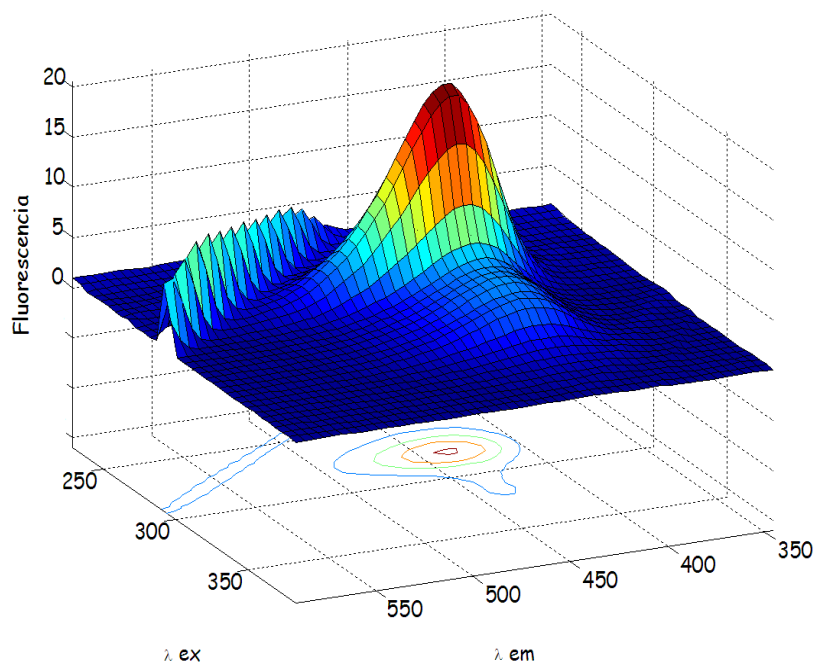


Figura 10. Ejemplo de un espectro tridimensional de fluorescencia representado con el programa FTOTAL para Matlab.

3.4. Felix32 para la obtención de curvas de decaimiento luminiscente y el cálculo de tiempos de vida

Ya se indicó que las curvas de decaimiento luminiscente se determinaron en los trabajos de esta Tesis utilizando el equipo TimeMaster PTI, el cual emplea tecnología estroboscópica (concretamente, un “Delay Gate Generator” o DGG) para asegurar que en todo momento la fuente de radiación y el detector se hallan sincronizados.

Para registrar las curvas de decaimiento de los analitos con tiempos de vida más largos (microsegundos) se utilizó como fuente de radiación la lámpara de xenón pulsada; mientras que para los que presentan tiempos de vida más cortos (nanosegundos) se empleó el láser de nitrógeno. En este último caso, el pulso de excitación puede solapar con la curva de decaimiento del analito, distorsionando los datos obtenidos. Este efecto se conoce como convolución. Para eliminarlo, se introduce en el compartimento de la muestra una disolución dispersante (generalmente Ludox) y se registra la señal procedente de la fuente de excitación fijando las longitudes de onda de excitación y de emisión a un mismo valor (concretamente, al valor de la longitud de onda de excitación al cual se miden las muestras de los analitos). La curva de decaimiento así obtenida se conoce como IRF (“Instrument Response Function”).

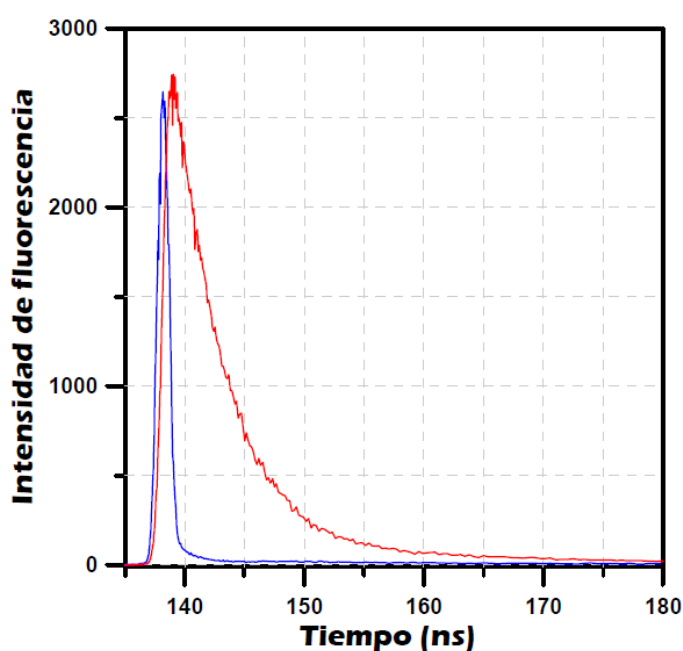


Figura 11. Curva de decaimiento fluorescente de un patrón (rojo) superpuesta con el pulso de la lámpara o IRF (azul).

A continuación, la curva de decaimiento obtenida experimentalmente al medir los analitos, así como el IRF, se introducen en una herramienta incluida en el software Felix 32, la cual está basada en el algoritmo desarrollado por Marquardt en 1963 [247]. Dicha herramienta es capaz de calcular el tiempo de vida del analito mediante comparación de los datos experimentales con un ajuste modelo. Matemáticamente, el problema puede plantearse de la siguiente forma [248-250]:

$$D(t) = \int_0^t P(t') \cdot G(t - t') dt \quad (1)$$

donde $D(t)$ es la curva de decaimiento obtenida experimentalmente, $P(t')$ es el IRF y $G(t-t')$ es una función de decaimiento modelo. Por tanto, el algoritmo incluido en el programa lleva a cabo el cálculo de los tiempos de vida mediante la convolución del IRF y la función modelo, y la posterior comparación del resultado con la curva de decaimiento obtenida experimentalmente. A partir de la curva modelo inicial, descrita por la ecuación 1, el programa realiza una serie de iteraciones hasta obtener la convergencia (la máxima aproximación posible de la curva de convolución a la curva experimental). El tiempo de vida calculado para el analito es el correspondiente a la curva modelo que da lugar a la convergencia ($G(t)$). En la ecuación 2, τ_i es el tiempo de vida del analito y a_i es un parámetro pre-exponencial. Suele ser necesario introducir inicialmente en el programa un valor estimado del tiempo de vida del analito analizado con el fin de agilizar y asegurar la convergencia.

$$G(t) = \sum_{i=1}^n a_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (2)$$

Existen varios criterios para verificar que los resultados obtenidos en el cálculo de los tiempos de vida son satisfactorios:

- El más usado es el **estadístico χ^2** (“chi cuadrado”), el cual se calcula de la siguiente forma: en primer lugar, la comparación del resultado de la convolución de la función modelo y el IRF con la curva de decaimiento experimental se lleva a cabo mediante una regresión de mínimos cuadrados no lineales, obteniéndose un conjunto de puntos que describe el obtenido experimentalmente. A

continuación, dicho conjunto se optimiza mediante minimización de la suma ponderada de las desviaciones al cuadrado de sus puntos frente a los del conjunto de puntos original, tal y como describe la ecuación 3.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n W_i [y(t_i) - Y(t_i)]^2 \quad (3)$$

donde $[Y(t_i)]$ son las desviaciones de los puntos del conjunto obtenido mediante regresión, $[y(t_i)]$ las del conjunto de datos original y W_i es un factor de ponderación que depende de cada punto (o canal) estudiado. El número de canales de los datos introducidos debe ser suficiente para que el programa haga una aproximación a una estadística gaussiana, de tal forma que la ecuación 3 puede describirse de la siguiente forma:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left\{ \frac{[D(t_i) - Y(t_i)]^2}{D(t_i)} \right\} \quad (4)$$

El valor ideal para el estadístico χ^2 es 1, siendo valores muy buenos los comprendidos entre 0,8 y 1,3. Valores inferiores a 0,75 indican un conjunto de datos demasiado pequeño para un correcto ajuste, mientras que valores superiores a 1,5 señalan una desviación muy significativa del ajuste.

- La calidad del ajuste también puede evaluarse mediante el estudio de los **valores residuales** (R_i), es decir, de las diferencias entre cada punto experimental y su correspondiente punto calculado:

$$R_i = D(t_i) - Y(t_i) \quad (5)$$

Un buen ajuste debe cumplir el criterio de homocedasticidad, es decir, debe tener unos residuales distribuidos aleatoriamente alrededor de un valor central de cero.

- La **función de autocorrelación** (C_j), relacionada con los residuales, también proporciona una sencilla comprobación visual de la calidad del ajuste. Se define

como una medida de la correlación entre los residuales del canal i y los del canal j para todos los canales (N):

$$C_j = \frac{\frac{1}{m} \sum_{l=1}^m R_l R_{l+j}}{\frac{1}{N} \sum_{l=1}^N R_l^2} \quad (6)$$

La distribución en este caso también debe ser aleatoria alrededor del cero.

- Una última forma de evaluar la calidad del ajuste es el cálculo del **parámetro de Durbin-Watson (DW)**, que viene dado por la ecuación 7:

$$DW = \frac{\sum_{i=1}^n [r(t_i) - r(t_{i+1})]^2}{\sum_{i=1}^n [r(t_i)]^2} \quad (7)$$

El parámetro DW se utiliza para evaluar correlaciones, de tal forma que un valor superior a 1,7 es indicativo de un buen ajuste.

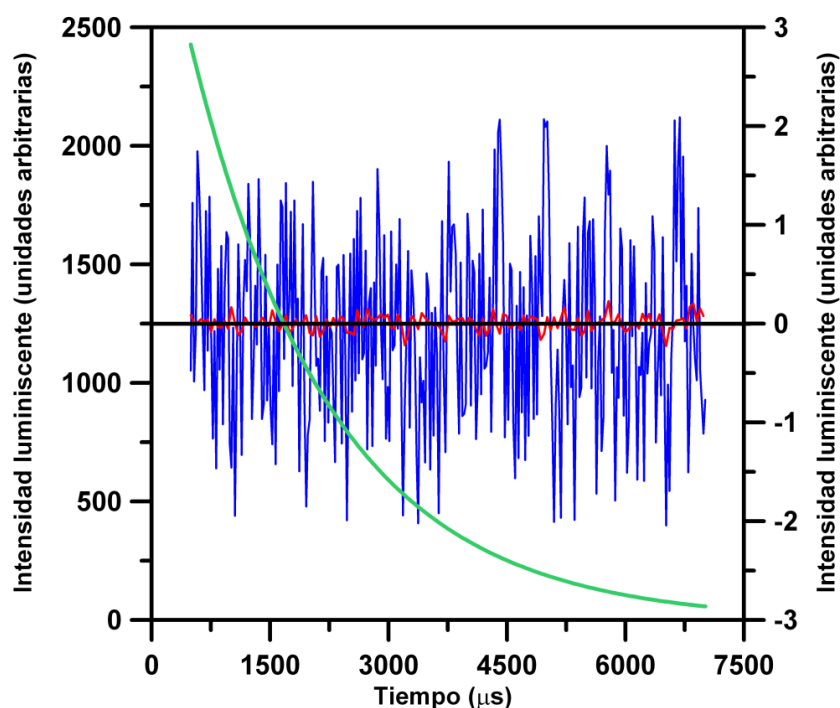
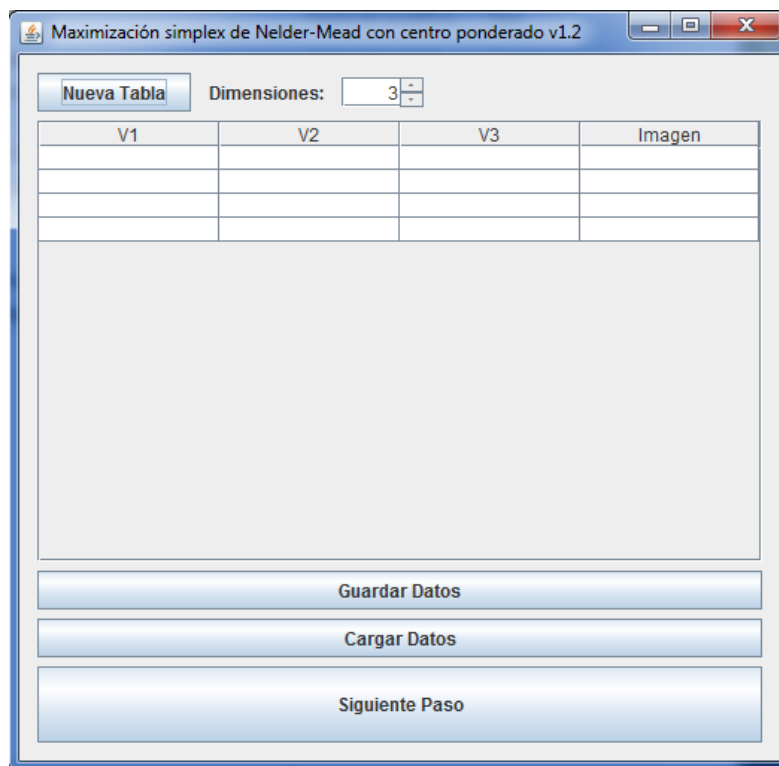


Figura 12. Representación del ajuste del decaimiento de un analito (verde), junto con sus residuales (azul) y su función de autocorrelación (rojo). El tiempo de vida calculado fue 1790,512 μ s, el valor de χ^2 1,075 y el del parámetro de Durbin-Watson 2,036.

3.5. Software empleado para la optimización mediante simplex

El programa **Max Simplex** para Windows, cuya pantalla se muestra en la figura 13, funciona mediante la plataforma Java y fue desarrollado por nuestro grupo de investigación [251]. Para comenzar a trabajar con él, en primer lugar, hay que indicar el número de dimensiones, es decir, el número de variables a optimizar. A continuación, se introducen valores iniciales de cada variable para cada uno de los puntos requeridos para comenzar el proceso (cuyo cantidad es el número de variables más uno). La diferencia entre los mínimos y máximos valores introducidos inicialmente para estas variables está orientada por ensayos previos disponibles acerca del sistema en estudio o, en su defecto, por datos existentes en la bibliografía para sistemas similares. En cualquier caso, los datos introducidos no serán críticos, ya que los simplex usados no son de máxima simetría. A continuación, se realizan las medidas experimentales para cada una de estas disoluciones, y las señales analíticas se introducen en las celdas “Imagen”.



V1	V2	V3	Imagen

Figura 13. Captura de la pantalla del programa Max Simplex.

Al pulsar sobre “siguiente paso”, el programa comienza con la primera iteración, para lo cual ordena los puntos de mayor a menor imagen y a continuación pide la imagen correspondiente a un punto reflejado, del cual nos indica los valores para cada variable. Seguidamente, tiene lugar uno de los casos expuestos en el capítulo de la presente Memoria dedicado a los métodos quimiométricos, tras lo cual finaliza la primera iteración.

El programa indica entonces cuáles son los vértices del simplex con el que comenzará la segunda iteración. Pueden editarse las celdas antes de comenzar ésta, de tal forma que pueden elegirse valores cercanos que coincidan mejor con la realidad de las medidas, evitándose así la propagación de errores en pasos posteriores. Mediante iteraciones sucesivas, se llega a un momento en el cual la diferencia entre las imágenes de los puntos del simplex es $\leq 5\%$. Cuando esto ocurre, se da por finalizado el proceso de optimización.

Como a lo largo de todo este procedimiento se hace uso de algoritmos matemáticos, en ocasiones puede obtenerse un vértice con alguna coordenada sin sentido químico (concentraciones negativas o un pH de 50, por ejemplo). En este caso, se recomienda dar una respuesta imaginaria de cero, de tal forma que se rechaza el vértice y se obliga al sistema de optimización a cambiar de dirección. Este procedimiento tiene el inconveniente de que también se rechazan las coordenadas que tienen sentido químico, al tratarse de un método ponderado. Sin embargo, debido a la alta convergencia, la dirección óptima se recupera en muy pocas experiencias posteriores.

3.6. Software empleado para la regresión multivariante

Para resolver las mezclas de analitos, los datos de las curvas de decaimiento registradas se analizaron mediante la subrutina para regresión multivariante de primer orden (MVC1), desarrollada para el programa de cálculo matemático MATLAB (MathWorks) por el grupo de investigación del profesor Olivieri [252]. Para que la

subrutina pueda trabajar correctamente, es necesario que en el momento del análisis se encuentren en su directorio los siguientes archivos:

- En primer lugar, el programa sólo puede trabajar con datos en forma de vectores. Por ello, cada curva de decaimiento (tanto de las muestras de calibración como de las de validación) se debe exportar desde Excel como un archivo de datos (.txt) que incluya una sola columna con todos los datos de intensidad luminiscente ordenados de menor a mayor tiempo. Es importante asegurarse de que todos los archivos contengan el mismo número de puntos.
- Con el fin de que el programa “sepa” que debe trabajar con estos archivos, es necesario crear un archivo de texto adicional en donde se encuentren, también en una columna, todos los nombres de los archivos correspondientes a las curvas de calibración (seguidos de la extensión “.txt”). De forma análoga debe crearse un archivo con todos los nombres de las muestras de validación.
- Además, debe crearse otro archivo de texto para cada uno de los componentes. Dichos archivos deben incluir, en una sola columna, las concentraciones de analito presentes en cada muestra de calibración. El orden debe ser el mismo que se utilice con el archivo de nombres.

Una vez generados todos estos archivos, se ejecuta a través de MATLAB la subrutina MVC1, cuya ventana tiene el aspecto mostrado en la figura 14. Debe comenzarse el análisis fijando todos los parámetros iniciales, los cuales se describen a continuación, en el mismo orden en el que aparecen en la ventana de la subrutina (figura 14):

- **Elección del método de regresión multivariante a utilizar:** por ejemplo, PCR o PLS-1).

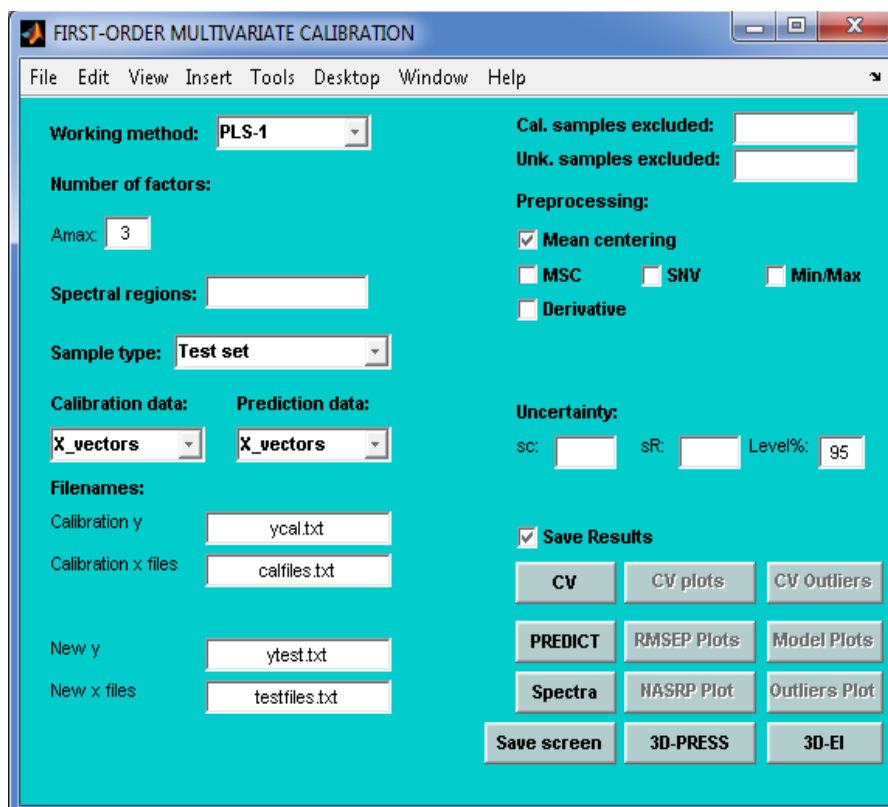


Figura 14. Captura de la pantalla principal de la subrutina MVC1.

- **Elección del número máximo de factores:** aunque el número de factores óptimo a menudo coincide con el número de componentes de la mezcla, en un primer momento es conveniente elegir un número de factores más alto que el número óptimo esperado, con el fin de poder comparar los resultados estadísticos en cada uno de los casos.
- **Elección de la región espectral:** si bien es cierto que puede trabajarse con todos los puntos experimentales, a menudo se obtienen mejores resultados si se eligen sólo aquéllos que realmente contienen información analítica relevante, eliminándose zonas en las que mayoritariamente hay ruido instrumental. El propio programa puede determinar *grosso modo* con qué zonas de las curvas de decaimiento es más conveniente trabajar.

- **Elección del tipo de muestras de predicción:** pueden ser muestras de validación con concentraciones conocidas (“Test set”) o muestras problema de concentraciones desconocidas (“Unknowns”).
- **Nombres de los archivos:** tanto de calibración como de validación, y tanto los que incluyen las concentraciones de los componentes como los que incluyen los nombres de los distintos archivos.
- **Preprocesamiento de los datos:** centrado en la media, derivadas...
- **Nivel de confianza:** generalmente se establece a un 95%.

Tras fijar todas las condiciones iniciales, se procede a la validación cruzada. Una vez ha finalizado ésta, se muestran en pantalla los resultados para cada uno de los factores analizados, incluyendo los valores para todos los parámetros estadísticos de interés. El análisis de estos permite determinar el número óptimo de factores, así como la posible presencia de curvas de decaimiento discrepantes.

A continuación, se repite el proceso pero utilizando el número de factores óptimo y excluyendo las muestras de calibración que sean puntos discrepantes. Para efectuar esto último, se escribe en la casilla “Cal. samples excluded” los números que indican la posición de cada una de estas muestras en el archivo de nombres. Debe llevarse a cabo análisis variando todos los parámetros, con el fin de optimizar lo más posible la matriz de calibración.

Por último, se procede al proceso de validación, utilizando la matriz de calibración optimizada anteriormente. Tras pulsar sobre el botón “Predict”, en pantalla aparecen los valores de cada uno de los parámetros de calidad, así como las líneas rectas que ajustan los datos de concentraciones predichas por el modelo frente a las teóricas y las elipses que incluyen las regiones de confianza para la ordenada y la pendiente de dichas rectas. También puede predecirse los valores de concentraciones de los analitos en muestras desconocidas.

3.7. Software para la generación de números aleatorios

Este programa es un macro para Excel diseñado por Ignacio Sánchez-Ferrer Robles siguiendo recomendaciones encontradas en bibliografía [253], y se utilizó para la selección de muestras aleatorias de validación en métodos multivariantes de análisis.

3.8. Software para la obtención de parámetros estadísticos

Para la obtención de rectas de calibrado globales y para el análisis de varianza se utilizó el programa de calibración diseñado en Visual Basic por José Antonio Murillo Pulgarín y Pablo Fernández López [254].

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE DOXICICLINA Y CLORTETRACICLINA MEDIANTE LUMINISCENCIA SENSIBILIZADA POR EUROPIO

Abstract

A simple luminescent methodology for the simultaneous determination of doxycycline and chlortetracycline in pharmaceutical preparations and human urine is proposed. Since the native fluorescence of both analytes is negligible, the method takes advantage of the lanthanide-sensitized luminescence, which provides a higher sensitivity. Due to the strong overlapping between the luminescence spectra of both europium complexes, the use of luminescence decay curves to resolve mixtures of the analytes is proposed, since these curves are more selective. A factorial design with two levels per factor coupled to a central composite design was selected to obtain a calibration matrix of thirteen standards plus one blank sample that was processed using a partial least-squares (PLS) analysis. In order to assess the goodness of the proposed method, a prediction set of ten synthetic samples was analyzed, obtaining recuperation percentages between 95 and 104 %. Limits of detection, calculated by means of a new criterion, were 3.27 and 1.06 $\mu\text{g L}^{-1}$ for doxycycline and chlortetracycline, respectively. The method was also tested in three different pharmaceutical preparations containing the analytes, obtaining an average recuperation percentage of 99.4 ± 1.8 for doxycycline and 100.5 ± 2.1 for chlortetracycline. Moreover, a central composite design was also developed to obtain a matrix of fifteen standards plus eleven analyte blanks that allowed the simultaneous determination of both tetracyclines in human urine samples. In this case, average recuperation percentages were 98.0 ± 4.4 and 97.8 ± 4.6 for doxycycline and chlortetracycline, respectively.

1. Generalidades

La doxiciclina (DC) es un antibiótico que actúa inhibiendo el crecimiento de las bacterias gram-positivas y gram-negativas. Se usa en el tratamiento de la neumonía y de otras infecciones, como la enfermedad de Lyme, el acné, la enfermedad periodontal y la malaria.

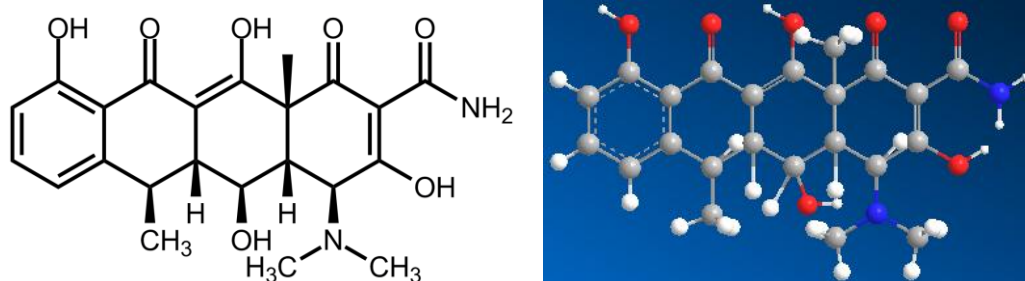


Figura 1. Estructura molecular en dos y tres dimensiones de la doxiciclina.

Por su parte, la clortetraciclina (CTC), producida por el hongo *Streptomyces aureofaciens*, fue la primera tetraciclina en ser descubierta. Tiene una gran actividad frente a diversos microorganismos, como estreptococos, estafilococos, neumococos, meningococos, gonococos, clamidias, micoplasmas, etc.

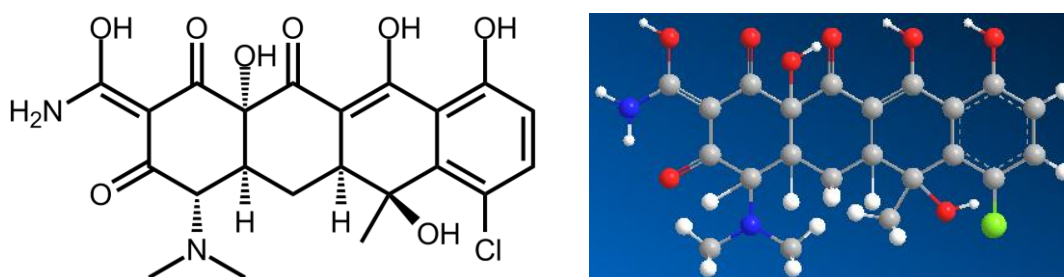


Figura 2. Estructura molecular en dos y tres dimensiones de la clortetraciclina.

Numerosos métodos se han usado hasta la fecha para determinar doxiciclina y clortetraciclina simultáneamente, si bien todos ellos hacen uso de una separación previa de los analitos. Destacan especialmente los métodos basados en HPLC, mediante los cuales se ha podido determinar ambas tetraciclinas en matrices tan diversas como leche [255, 256], tejidos animales [257, 258], pescado [259, 260], aguas residuales [261] o preparaciones farmacéuticas [262]. Recientemente se ha utilizado HPLC acoplada a Resonancia de Scattering Rayleigh (RRS) para la determinación de cuatro tetraciclinas en miel y preparaciones farmacéuticas [263]. También se ha aplicado RRS para determinar tetraciclinas en sangre y orina [264]. Otros métodos se basan en electroforesis capilar [265, 266] o en sensores ópticos [267-270].

Por otra parte, y aunque la fluorescencia nativa de las tetraciclinas en medio acuoso no es muy intensa, han podido desarrollarse varios métodos de determinación luminiscente gracias a la sensibilización mediante lantánidos [17, 19, 21, 23, 24, 29, 271-273]. En estos métodos, el grupo β -cetónico de las tetraciclinas actúa como un ligando bidentado que se une al ion Eu^{3+} . La estequiometría de estos quelatos es 1:1 [17, 19]. Una vez ha tenido lugar la excitación de las moléculas de tetraciclina, se produce un entrecruzamiento entre sistemas seguido de una transferencia de la energía a los niveles 4f del ion europeo, el cual es responsable de la luminiscencia observada. El pico de emisión más intenso aparece a 617 nm, y su intensidad es proporcional a la concentración de tetraciclina en la muestra. Como ya se indicó en esta memoria, el uso de ligandos sinérgicos y de surfactantes produce un aumento aún mayor de la intensidad luminiscente. Se han desarrollado diversos métodos analíticos, como HPLC o análisis por inyección en flujo (FIA), que emplean luminiscencia sensibilizada por europio como sistema de detección [273], tal y como señala Gabriela A. Ibáñez [24].

2. Características espectrales de los analitos

Como ya se ha comentado anteriormente, la fluorescencia nativa de las tetraciclinas es muy poco intensa. Sin embargo, este problema queda solucionado haciendo uso de la luminiscencia sensibilizada por lantánidos. En las figuras 3 y 4 se pueden ver los espectros tridimensionales de los complejos doxiciclina-europio y

clortetraciclina-europio ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito; $\text{pH} = 8,2$; $8,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de europio)) en presencia de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) ($1,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) como agente sinérgico y de cloruro de cetiltrimetilamonio (CTACl) (0,5 % v/v) como surfactante.

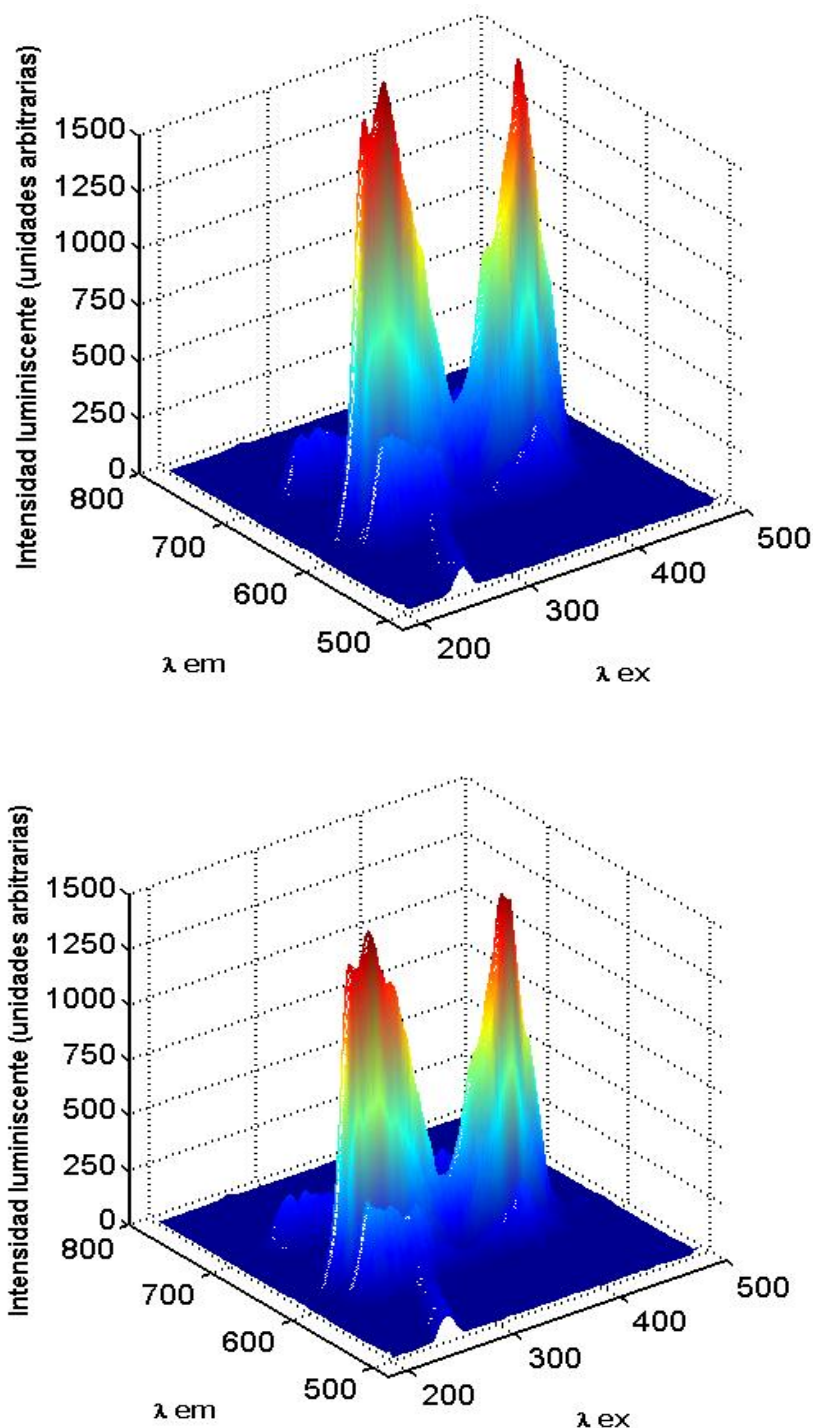


Figura 3. Espectros tridimensionales de luminiscencia de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo)

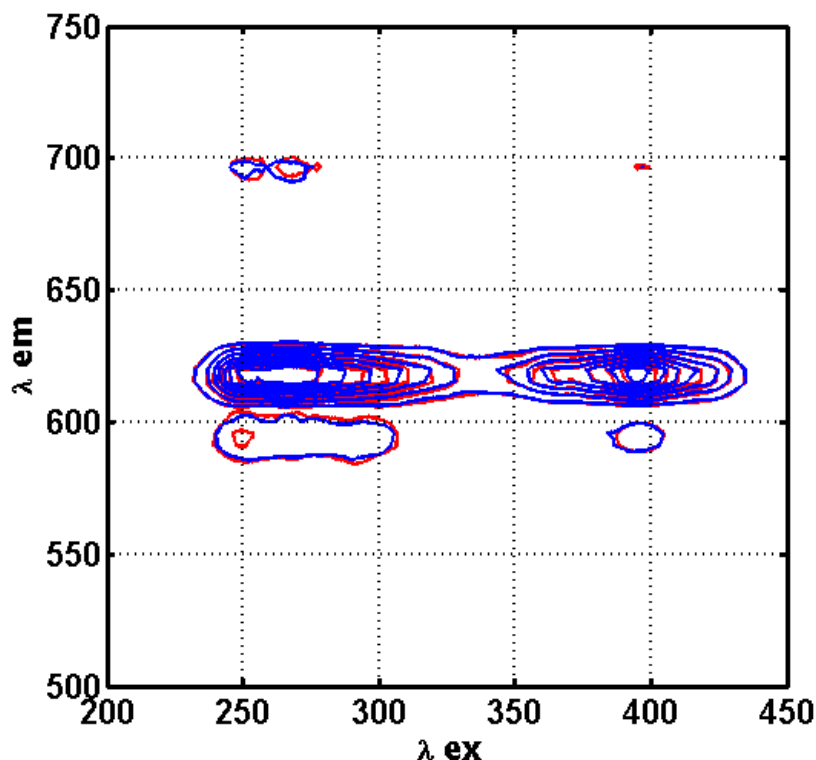


Figura 4. Curvas de nivel de la luminiscencia de los complejos de doxiciclina-Eu (en azul) y clortetraciclina-Eu (en rojo).

Como se puede apreciar en las figuras 3 y 4, ambos espectros son prácticamente iguales. Presentan dos bandas anchas de excitación, una entre 220 y 330 nm y otra entre 330 y 440 nm, aproximadamente, siendo más intensa la primera para el complejo doxiciclina-europio y más intensa la segunda para el complejo clortetraciclina-europio. Los máximos de emisión son idénticos para ambos, ya que la emisión tiene lugar desde los niveles de energía 4f del ion lantánido. Son tres picos estrechos a 594, 617 y 694 nm, siendo el intermedio el más intenso. Debido al completo solapamiento existente entre los dos espectros, la determinación simultánea de ambos analitos mediante fluorescencia convencional resulta inviable. Por ello, se decidió abordar la metodología de luminiscencia resuelta en el tiempo, que implica en primer lugar el estudio de las curvas de decaimiento y de los tiempos de vida de ambos complejos.

3. Estudio de los tiempos de vida de luminiscencia

Las curvas de decaimiento luminiscente de ambos analitos (condiciones químicas del apartado anterior; $\lambda_{\text{exc}} = 392 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) aparecen representadas en la figura 5.

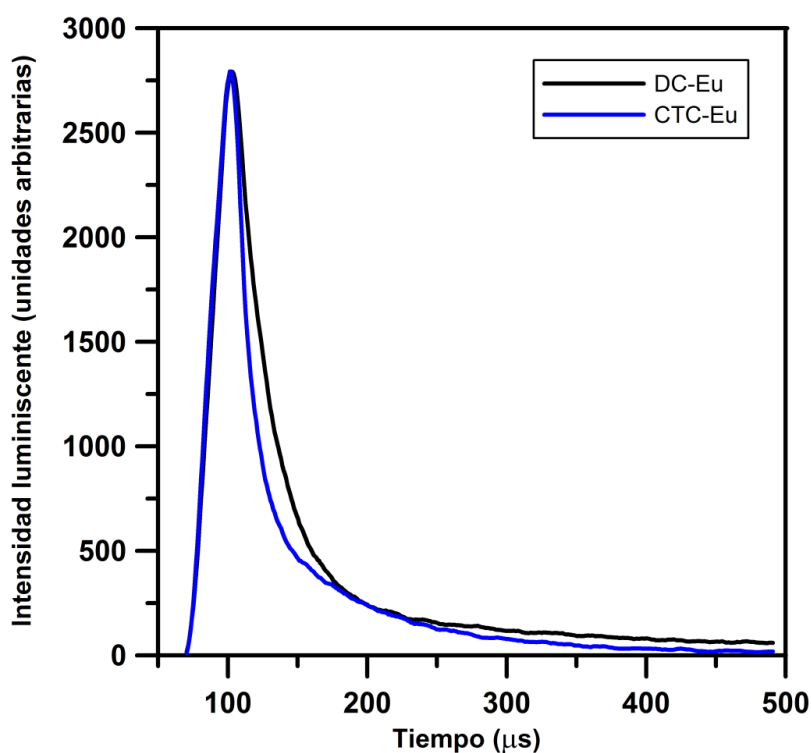


Figura 5. Curvas de decaimiento luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

En la figura 6 se muestran los ajustes obtenidos mediante el algoritmo de Marquardt [247], contenido en el software del equipo (Felix32), y en la tabla 1 aparecen recogidos los parámetros estadísticos obtenidos en el cálculo.

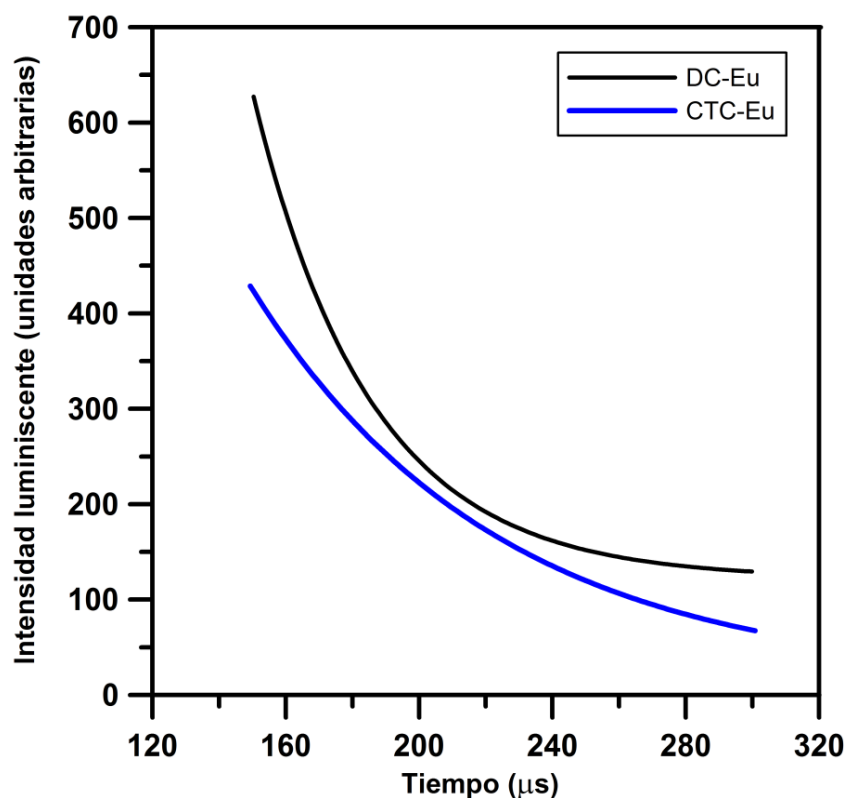


Figura 6. Ajustes obtenidos para las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

Tabla 1. Tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad para los complejos de doxiciclina y clortetraciclina con europio.

Parámetro	DC-Eu	CTC-Eu
χ^2	0,93	0,96
DW	2,28	2,31
Preexponencial	$15,4 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3 \pm 1,42 \cdot 10^2$
Tiempo de vida (μs)	$35,21 \pm 0,96$	$73,5 \pm 3,1$

Como puede verse en la tabla 1, los ajustes son satisfactorios, ya que el parámetro χ^2 se encuentra entre 0,8 y 1,3 y los valores del parámetro de Durbin-Watson (DW) son superiores a 1,7. Además, la distribución tanto de la función de autocorrelación como de los residuales fue en ambos casos aleatoria alrededor del cero. Los tiempos de vida medios para los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu son

aproximadamente 35 y 74 μ s, respectivamente. Por tanto, las curvas de decaimiento luminiscente son suficientemente diferentes como para permitir la determinación simultánea de ambas tetraciclinas mediante el uso de métodos de calibración multivariante.

4. Estabilidad de las disoluciones

Se prepararon disoluciones madre tanto de doxiciclina como de clortetraciclina 50,0 mg L⁻¹ disolviendo en agua destilada sus correspondientes hidroclouros. Estas disoluciones se conservaron en la oscuridad a una temperatura de 4°C, y a partir de ellas se obtuvieron las disoluciones de trabajo.

Se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de estas disoluciones midiendo la absorbancia de las tetraciclinas (máximo a 350 nm) mediante un espectrofotómetro todos los días durante tres semanas. Las variaciones en la absorbancia fueron en todas estas medidas inferiores a $\pm 5\%$, y, por tanto, se consideró que ambas disoluciones eran estables durante, al menos, el período estudiado.

5. Optimización secuencial de variables

5.1. Optimización de variables químicas

Se utilizó en todos los casos una concentración de 500,0 μ g L⁻¹, tanto para la doxiciclina como para la clortetraciclina. Las variables químicas iniciales, que aparecen recogidas en la tabla 2, fueron las encontradas en un trabajo anterior [24].

Tabla 2. Variables químicas iniciales.

pH	9,0
[Eu] (mol L⁻¹)	10 ⁻⁴
[EDTA] (mol L⁻¹)	10 ⁻⁴
[CTACl] (%)	0,5

5.1.1. Influencia de la presencia de EDTA y/o CTACl. Optimización del pH

En primer lugar se decidió estudiar la influencia que tiene en la intensidad de emisión luminiscente la presencia de EDTA y de CTACl, tanto individual como simultáneamente, así como la variación de la señal con el pH en cada caso. Para ello se prepararon cuatro series de disoluciones (tetraciclina-Eu, tetraciclina-Eu-EDTA, tetraciclina-Eu-CTACl y tetraciclina-Eu-EDTA-CTACl), a las cuales se varió el pH mediante la adición de cantidades adecuadas de HCl o NaOH.

Como muestra la figura 7, la intensidad luminiscente aumenta drásticamente cuando están presentes en la disolución tanto EDTA como CTACl, tal y como era de esperar. El pH al cual se obtiene la máxima señal se encuentra comprendido en todos los casos entre 8 y 9. Teniendo en cuenta todos estos resultados, se decidió seguir trabajando en presencia de EDTA y de CTACl, y a un valor de pH de 8,2, que se corresponde con la máxima emisión del complejo clortetraciclina-Eu. El valor óptimo de pH para el complejo doxiciclina-Eu es ligeramente inferior, pero se decidió elegir 8,2 con el fin de tratar de obtener intensidades luminiscentes similares para ambos analitos.

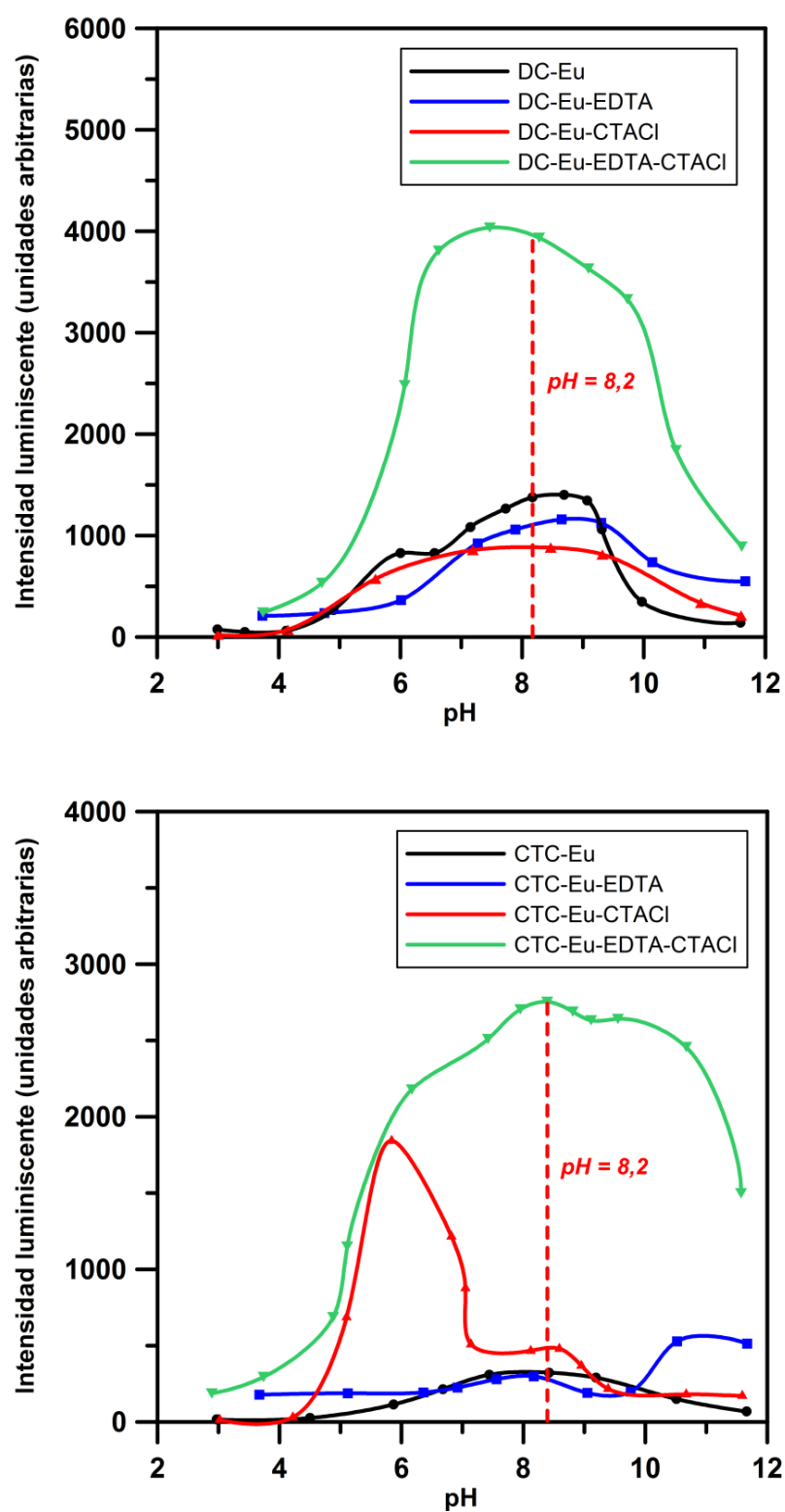


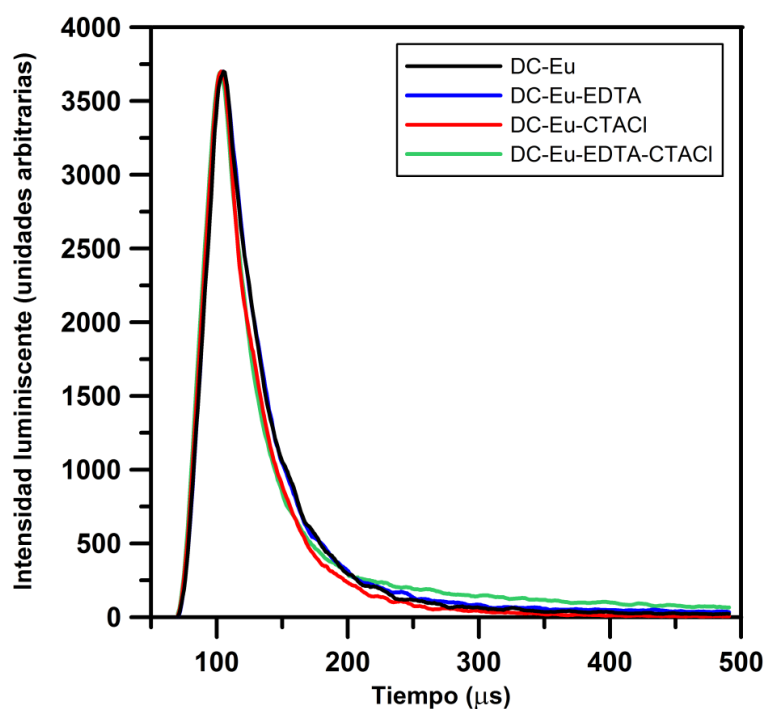
Figura 7. Influencia del pH y de la presencia de EDTA y/o CTACl en la luminiscencia de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

Los valores de los tiempos de vida se mantuvieron aproximadamente constantes en todos los casos, salvo a pH extremos. Sin embargo, sí se observó un aumento del tiempo de vida del complejo clortetraciclina-Eu cuando el EDTA se encontraba presente, tal y como muestra la tabla 3. Este hecho resulta ventajoso para el método aquí desarrollado, pues la presencia de EDTA implica una mayor separación entre las curvas de decaimiento luminiscente de ambos complejos.

Tabla 3. Tiempos de vida calculados para distintas combinaciones de reactivos con los complejos DC-Eu y CTC-Eu.

Reactivo Adicional	τ DC-Eu (μ s)	τ CTC-Eu (μ s)
-	34,97	44,54
EDTA	36,57	62,82
CTACI	34,92	45,00
EDTA+CTACI	34,94	73,11

Estos cambios en los valores de los tiempos de vida de luminiscencia se deben a diferencias en la forma de las curvas de decaimiento (ver figura 8), las cuales son, a su vez, consecuencia de cambios en el entorno químico de los analitos.



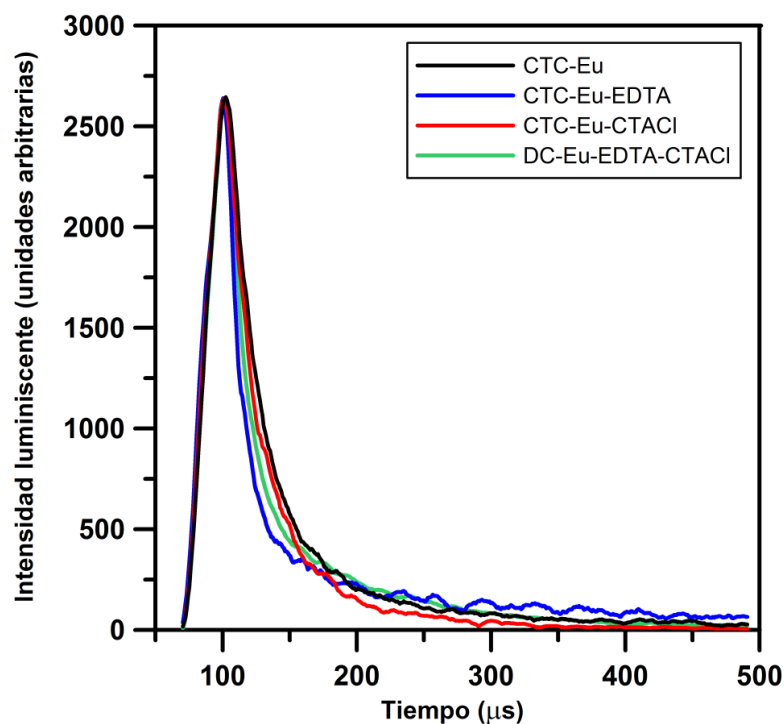


Figura 8. Curvas de decaimiento luminiscente normalizadas para los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo) cuando distintas combinaciones de reactivos están presentes a pH 8,2.

5.1.2. Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima

Se ensayaron dos disoluciones reguladoras diferentes al pH optimizado de 8,2: tampón dihidrógenofosfato/hidrógenofosfato ($pK_a=7,21$) y tampón Tris, es decir, tris(hidroximetil)aminometano ($pK_a=8,06$). El intervalo de concentraciones estudiado estuvo comprendido entre $0,01$ y $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ en ambos casos.

Se observó experimentalmente (figura 9) que, en todos los casos, un aumento en la concentración del tampón produce una disminución en la señal luminiscente. La caída es especialmente importante para la luminiscencia del complejo doxiciclina-Eu en presencia de tampón fosfato.

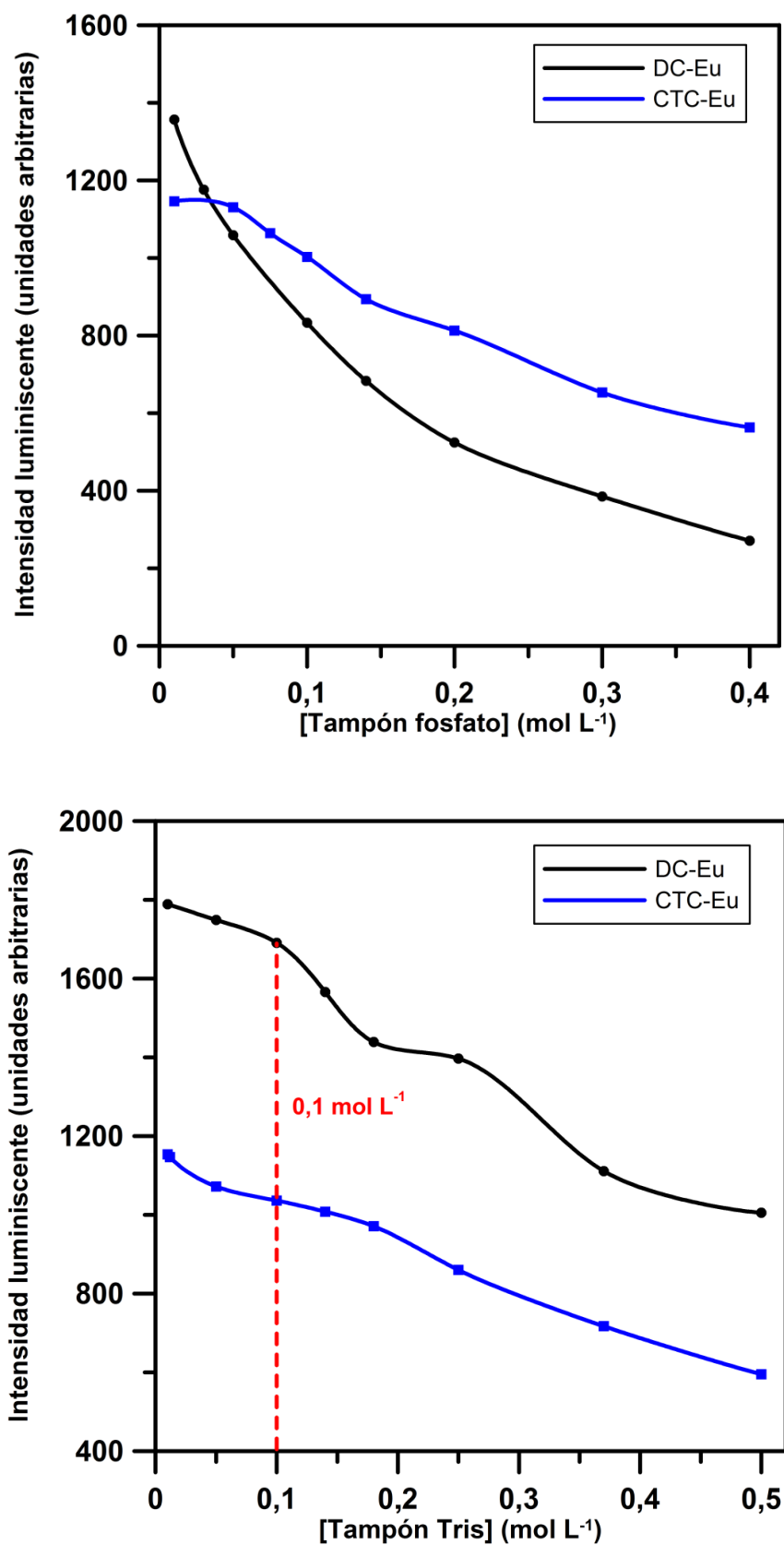


Figura 9. Influencia de la naturaleza y concentración de la disolución reguladora. Tampón dihidrógenofosfato/hidrógenofosfato (arriba) y tampón Tris (abajo).

En la elección del tampón y de su concentración óptima se tuvo en cuenta los siguientes hechos:

- A concentraciones bajas, se obtiene mayor intensidad luminiscente, pero la capacidad reguladora del tampón podría verse comprometida en las aplicaciones del método.
- A concentraciones mayores, a pesar de que la señal luminiscente disminuye, la capacidad reguladora queda garantizada.

Se eligió finalmente el tampón Tris a una concentración de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para experiencias posteriores por dos motivos: en primer lugar, su capacidad reguladora al pH elegido como óptimo es mayor (su pKa está más próximo a 8,2 que el del tampón fosfato); en segundo, con él se obtiene una intensidad luminiscente mayor.

5.1.3. Optimización de la concentración de europio

Se estudió a continuación la influencia de la concentración de la disolución de europio, variando ésta entre $1,00 \cdot 10^{-6}$ y $1,30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Al representar los datos (figura 10) se aprecian dos tendencias: la señal comienza aumentando según se incrementa la concentración de europio hasta $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para caer bruscamente y a continuación volver a crecer aún más. Es posible que estas dos tendencias se deban a un cambio en la estequiometría del complejo. De hecho, tal y como muestran la figura 11 y la tabla 4, el cambio tanto en la forma de las curvas de decaimiento luminiscente como en los valores de los tiempos de vida entre ambas regiones es muy llamativo.

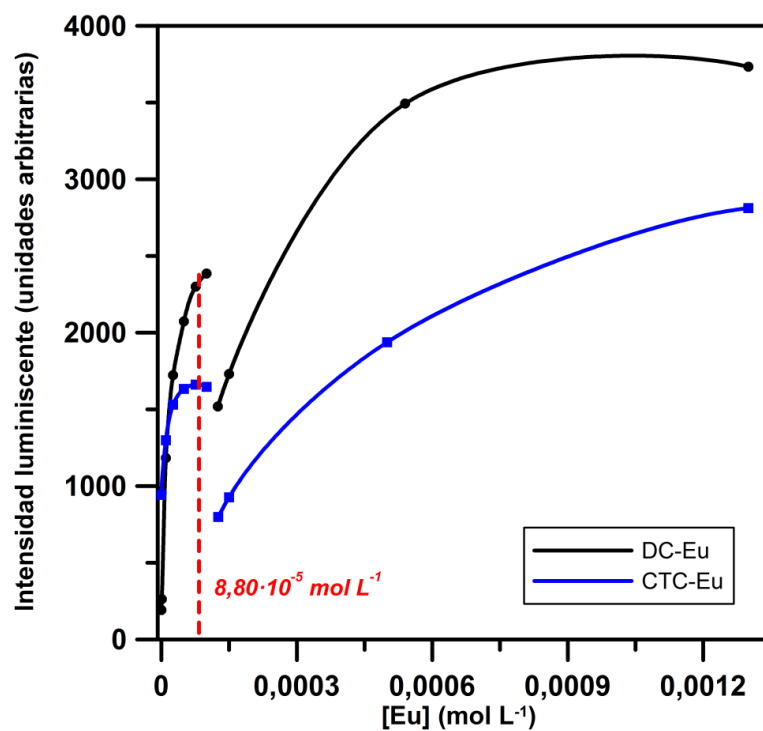


Figura 10. Influencia de la concentración de la disolución de europio en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

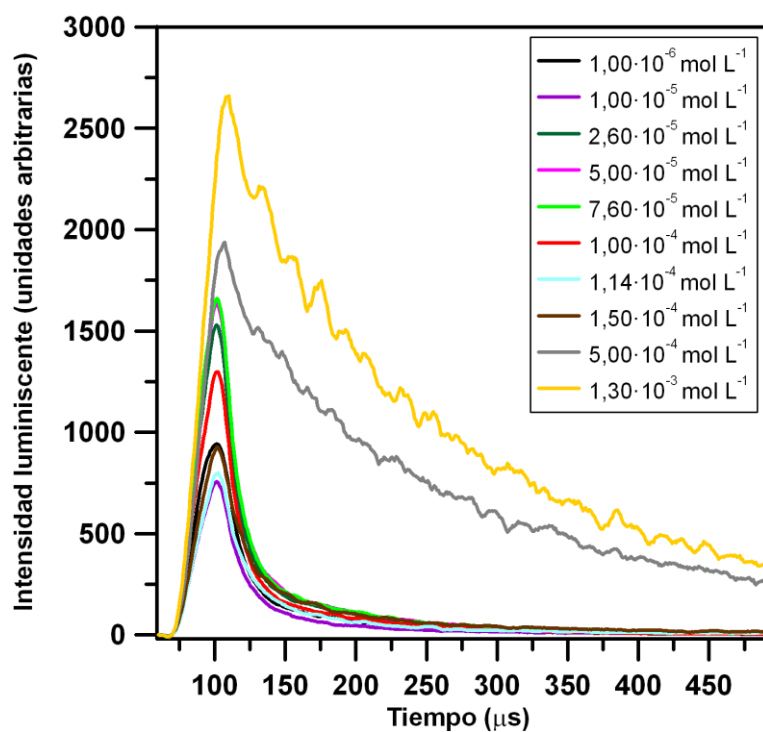


Figura 11. Curvas de decaimiento para los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo) en el estudio de la influencia de la concentración de Eu.

Tabla 4. Tiempos de vida calculados para los complejos DC-Eu y CTC-Eu a distintas concentraciones de europio.

[Europio] (mol L⁻¹)	τ DC-Eu (μs)	τ CTC-Eu (μs)
1,00·10 ⁻⁶	43,24	71,89
1,00·10 ⁻⁵	40,97	74,68
2,60·10 ⁻⁵	40,21	76,83
5,00·10 ⁻⁵	40,84	73,91
7,60·10 ⁻⁵	34,19	75,17
1,00·10 ⁻⁴	34,18	71,42
1,14·10 ⁻⁴	75,60	50,69
1,50·10 ⁻⁴	72,93	51,82
5,00·10 ⁻⁴	123,20	112,90
1,30·10 ⁻³	122,23	124,72

Se eligió una concentración óptima de Eu de $8,80 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, valor comprendido entre los dos valores que delimitan la máxima intensidad alcanzada en la primera zona ($7,60 \cdot 10^{-5}$ y $1,00 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹), y que se encuentra muy próximo al valor recomendado en bibliografía [24].

5.1.4. Optimización de la concentración de EDTA

La presencia de EDTA como coligando en las disoluciones de trabajo produce un aumento en la intensidad de luminiscencia. Al mismo tiempo, también permite aumentar el pH de trabajo sin que se produzca la precipitación del lantánido.

En el estudio aquí presentado se varió la concentración de EDTA entre $1,00 \cdot 10^{-7}$ y $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. La figura 12 muestra que, para ambos complejos, se produce un aumento muy pronunciado en la señal luminiscente al aumentar la concentración de EDTA. Esto es lógico, puesto que, como ya se comentó, el EDTA actúa como ligando sinérgico. Sin embargo, por encima de $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, la intensidad luminiscente se

mantiene ya en una meseta, cayendo incluso ligeramente con las concentraciones de EDTA más altas ensayadas.

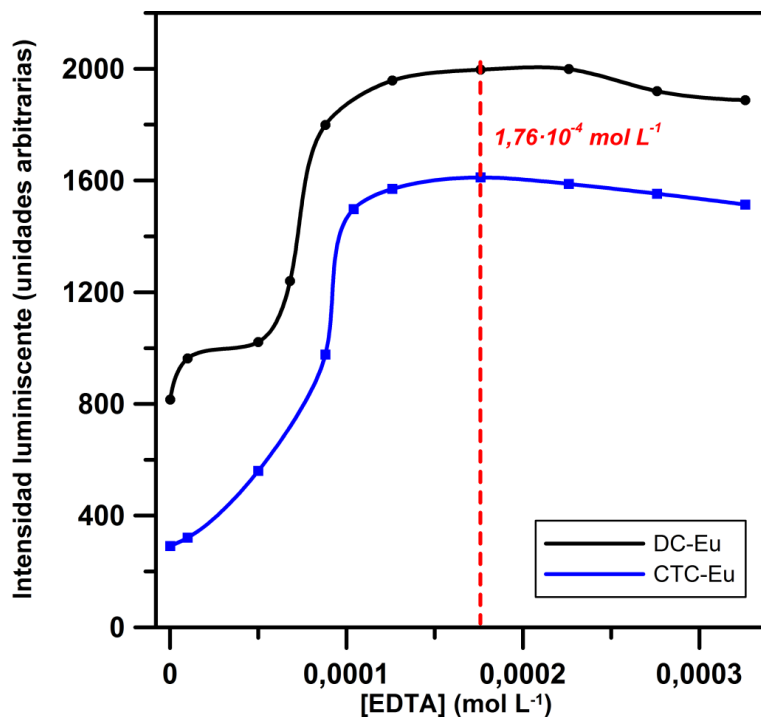


Figura 12. Influencia de la concentración de EDTA en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

Como puede verse en la tabla 5, el tiempo de vida del complejo doxiciclina-Eu no varía significativamente con la presencia y concentración de EDTA, pero sí lo hace el del complejo clortetraciclina-Eu, tal y como se había observado anteriormente (ver tabla 3).

Se eligió como valor óptimo una concentración de EDTA de $1,76 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ porque este valor proporciona tanto la máxima intensidad luminiscente como la mayor separación entre los tiempos de vida de los dos complejos.

Tabla 7. Tiempos de vida calculados para los complejos DC-Eu y CTC-Eu a distintas concentraciones de EDTA.

[EDTA] (mol L⁻¹)	τ DC-Eu (μs)	τ CTC-Eu (μs)
1,00·10 ⁻⁷	38,44	35,48
1,00·10 ⁻⁵	38,51	47,96
5,00·10 ⁻⁵	37,26	50,64
6,80·10 ⁻⁵	35,59	44,61
8,80·10 ⁻⁵	36,17	65,74
1,26·10 ⁻⁴	37,59	72,22
1,76·10 ⁻⁴	34,59	77,59
2,26·10 ⁻⁴	36,86	73,45
2,76·10 ⁻⁴	37,19	70,57
3,26·10 ⁻⁴	38,55	72,30

5.1.5. Optimización de la concentración de CTACl

La figura 13 muestra el resultado del estudio de la influencia de la concentración de CTACl en el intervalo comprendido entre 0,1 y 5% v/v.

Se eligió como valor óptimo 0,5% v/v, aun cuando para el complejo doxiciclina-Eu se obtiene una mayor intensidad a porcentajes superiores, con el fin de tratar de acercar los valores de intensidad luminiscente de ambos complejos. La presencia de CTACl no modifica los tiempos de vida de los complejos, tal y como ya se había comprobado anteriormente (véase la tabla 3). Al variar el porcentaje de este compuesto, los tiempos de vida también se mantuvieron constantes en todos los casos.

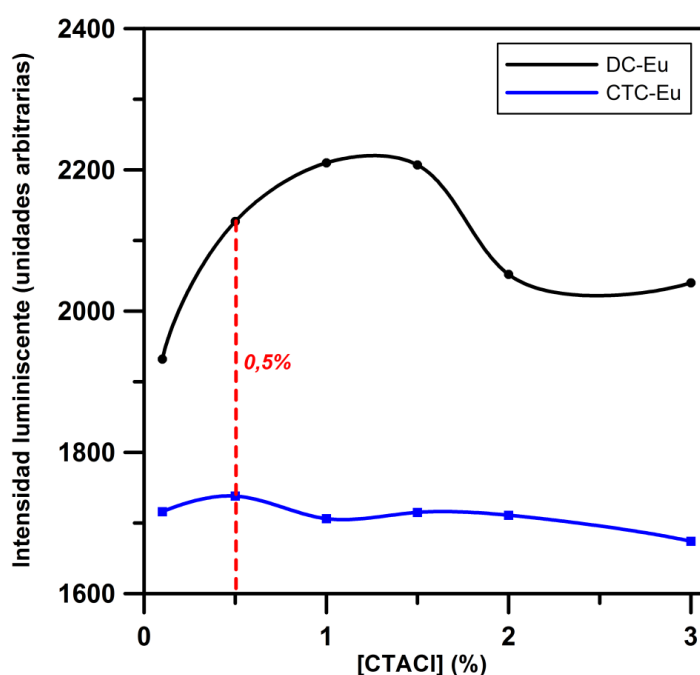


Figura 13. Influencia de la concentración de CTACl en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

5.1.6. Influencia de la temperatura

Para completar la influencia de las variables químicas, se llevó a cabo el estudio de la variación de la señal luminiscente con la temperatura. Teóricamente, la intensidad de los fenómenos luminiscentes se ve drásticamente disminuida con el aumento de la temperatura. Esta tendencia se apreció también experimentalmente, como puede observarse en la figura 14.

El valor elegido como óptimo fue 20 °C, pues, a pesar de no obtenerse con él la máxima señal luminiscente, se trata de un valor cercano a la temperatura ambiente y, por tanto, fácil de termostatizar.

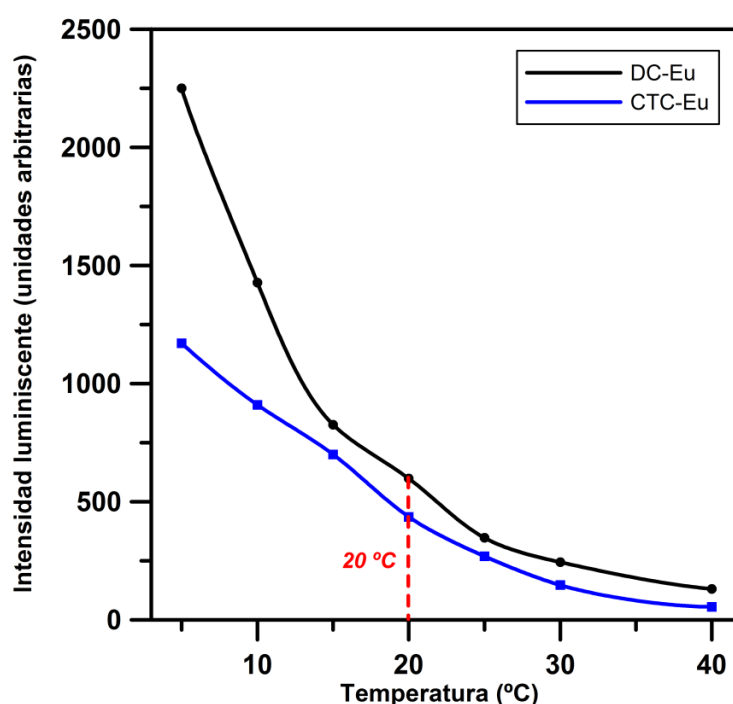


Figura 14. Influencia de la temperatura en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.

5.2. Optimización de variables instrumentales

Utilizando todos los valores seleccionados anteriormente para las variables químicas, a continuación se procedió a la optimización de las variables instrumentales. Para ello, se tuvo en cuenta la maximización tanto de la intensidad fluorescente como de la relación señal/ruido. El ruido instrumental se calculó sustrayendo a la cola de la curva de decaimiento obtenida experimentalmente esa misma señal, pero tratada con un factor de 21 puntos de suavizado, y calculando la desviación estándar de dicha resta. Los valores de las variables instrumentales no modifican los tiempos de vida de los analitos, si bien en algunos casos la señal obtenida no tiene la calidad suficiente como para poder ser utilizada en el cálculo de tiempos de vida fiables.

En todo este proceso se mantuvo constante una concentración de $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$, tanto para la doxiciclina como para la clortetraciclina, y se registró la curva de

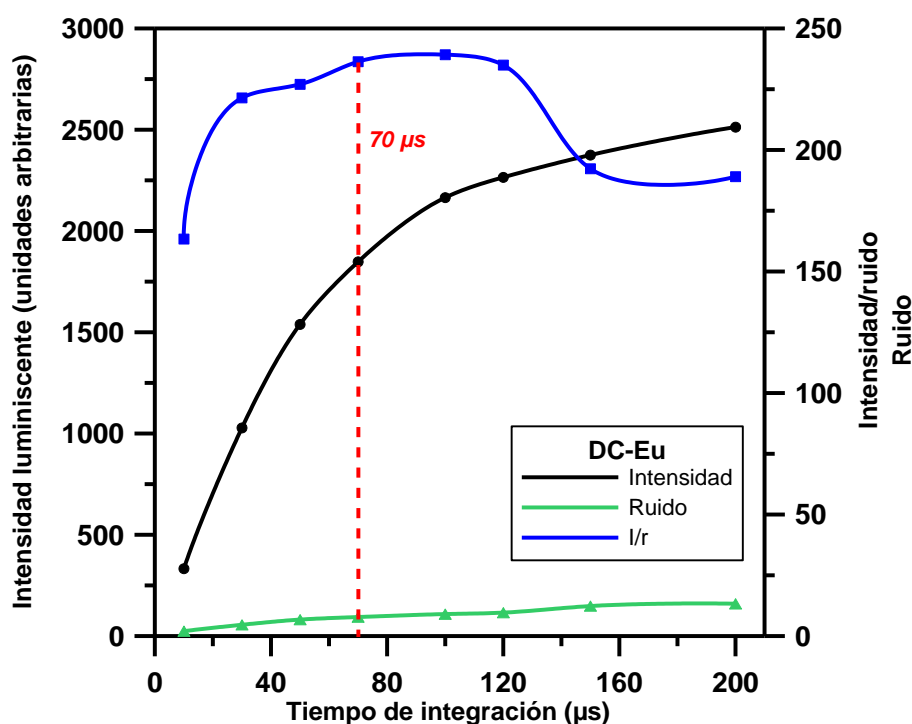
decaimiento luminiscente entre 30 y 500 μs . Los parámetros iniciales del proceso de optimización de las variables instrumentales fueron los recogidos en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros instrumentales iniciales.

Tiempo de integración	30 μs
Frecuencia	100 Hz
Número de canales	500
Número de medias	3
Número de disparos	5

5.2.1. Optimización del tiempo de integración

El tiempo de integración de la señal luminiscente puede definirse como el tiempo que el fotomultiplicador permanece activo, detectando la señal que le llega de la muestra. Se estudió un intervalo comprendido entre 10 y 200 μs para este parámetro (ver figura 15).



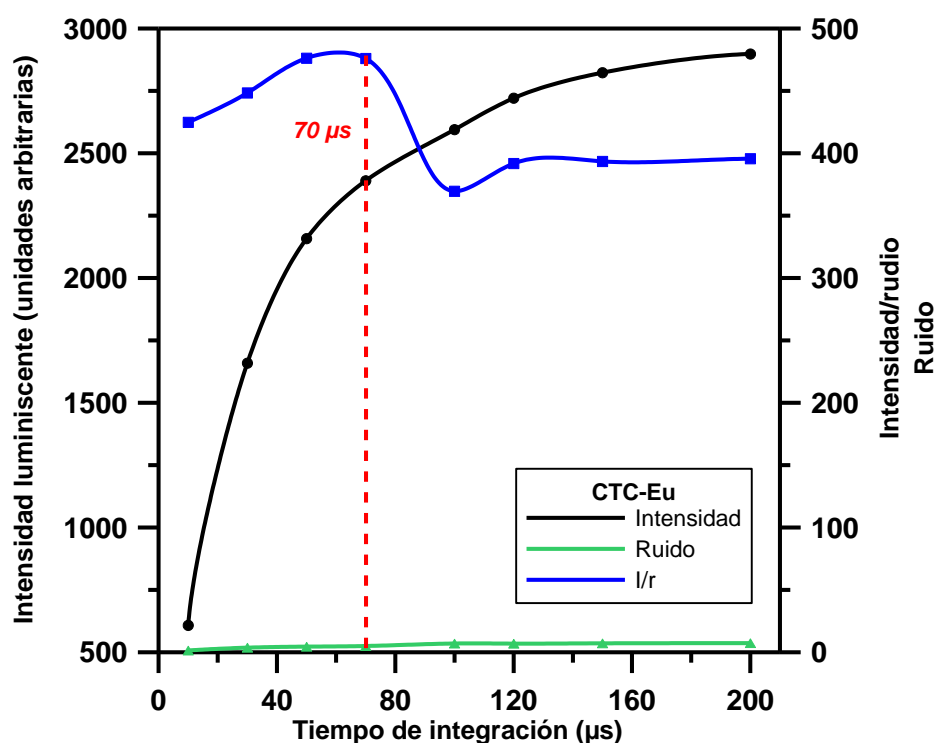


Figura 15. Influencia del tiempo de integración en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

Como valor óptimo se escogió 70 μ s, ya que por debajo de este valor la intensidad medida es demasiado pequeña, mientras que por encima la relación señal/ruido disminuye excesivamente en el caso de la clortetraciclina.

5.2.2. Optimización del número de disparos

Este parámetro instrumental determina el número de “disparos” o destellos de la lámpara pulsada para cada punto registrado en la curva de decaimiento. El aumento del número de disparos no afecta a la intensidad de luminiscencia, pero sí incrementa la relación señal/ruido a costa de un mayor tiempo de análisis. Generalmente, y por razones estadísticas, es preferible realizar una media entre un mayor número de curvas de un decaimiento que aumentar el número de disparos.

Se estudió el número de disparos en el intervalo comprendido entre 1 y 20 (ver figura 16).

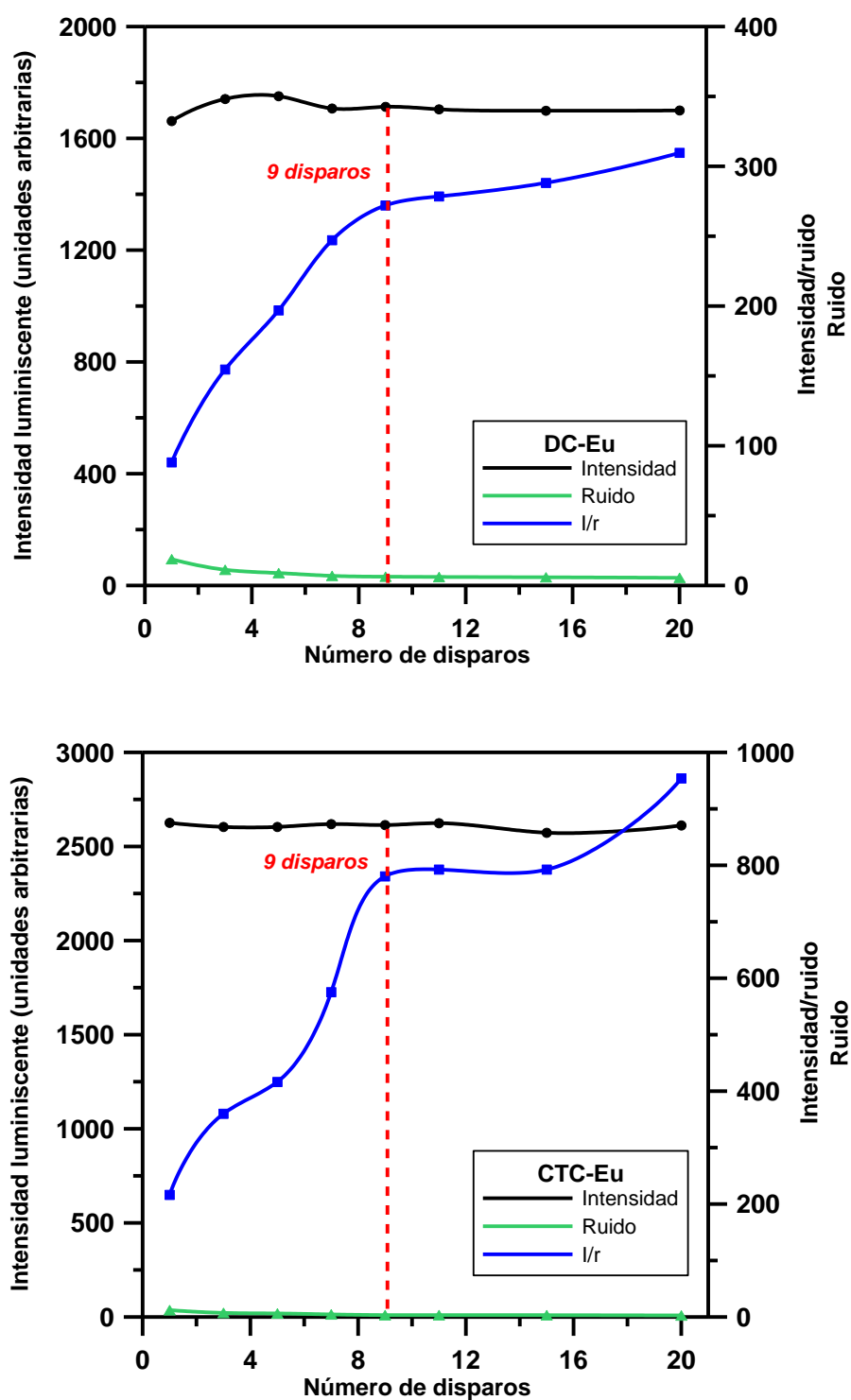
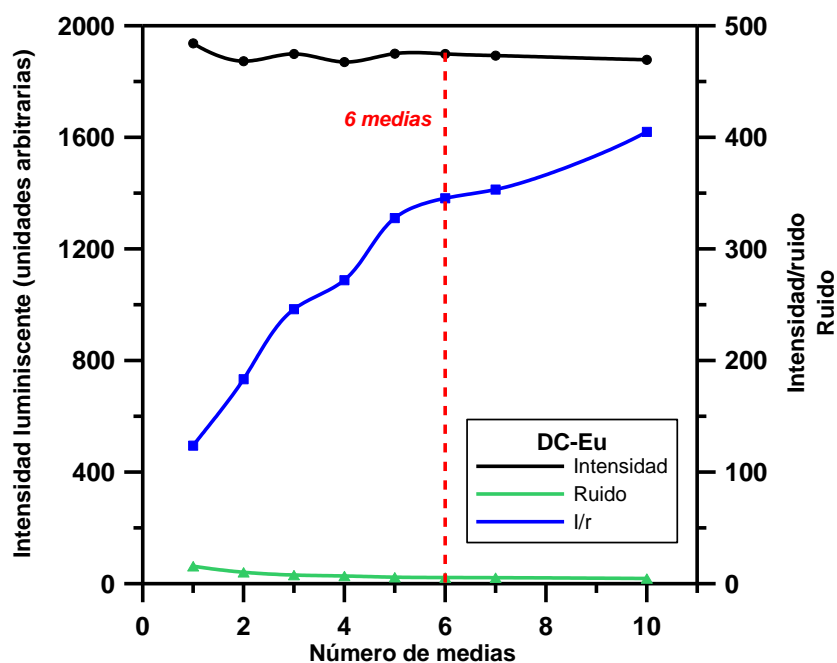


Figura 16. Influencia del número de disparos de la lámpara en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

Se eligió 9 como número óptimo de disparos puesto que a valores superiores la relación señal/ruido ya no aumenta significativamente y, sin embargo, los tiempos de análisis se hacen excesivamente largos.

5.2.3. Optimización del número de medias

El equipo registra tantas veces la curva de decaimiento luminiscente como le indique el valor de este parámetro. Simultáneamente, va realizando la media entre los puntos equivalentes de las diferentes curvas adquiridas. Evidentemente, al aumentar el “número de medias” la intensidad luminiscente no cambia, pero el nivel de ruido se reduce drásticamente. Asimismo, el tiempo de registro aumenta de forma proporcional. Se estudió este parámetro entre una y diez medias y se eligió seis como valor óptimo, a pesar de que la relación señal/ruido seguía aumentando con el número de medias, con el fin de no tener tiempos de registro excesivamente largos.



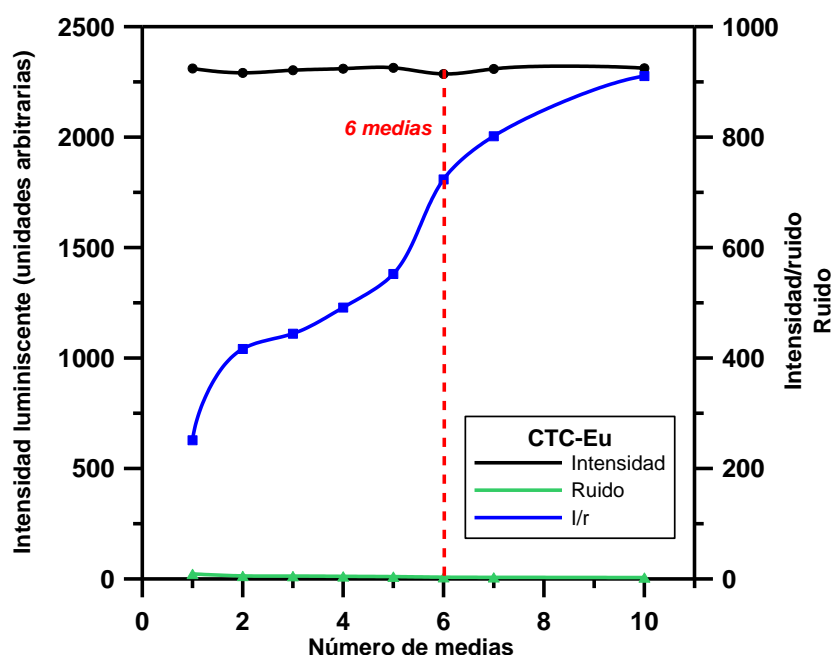


Figura 17. Influencia del número de medias en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

5.2.4. Optimización de la frecuencia de destellos

Este parámetro controla el número de destellos por segundo que efectúa la lámpara pulsada del equipo. Al aumentar la frecuencia disminuye el tiempo de análisis, pero el ruido instrumental se incrementa. Sin embargo, experimentalmente se comprobó que este último efecto sólo influye negativamente en la relación señal/ruido a frecuencias superiores a 200 Hz. En consecuencia, este valor se eligió como frecuencia óptima de trabajo.

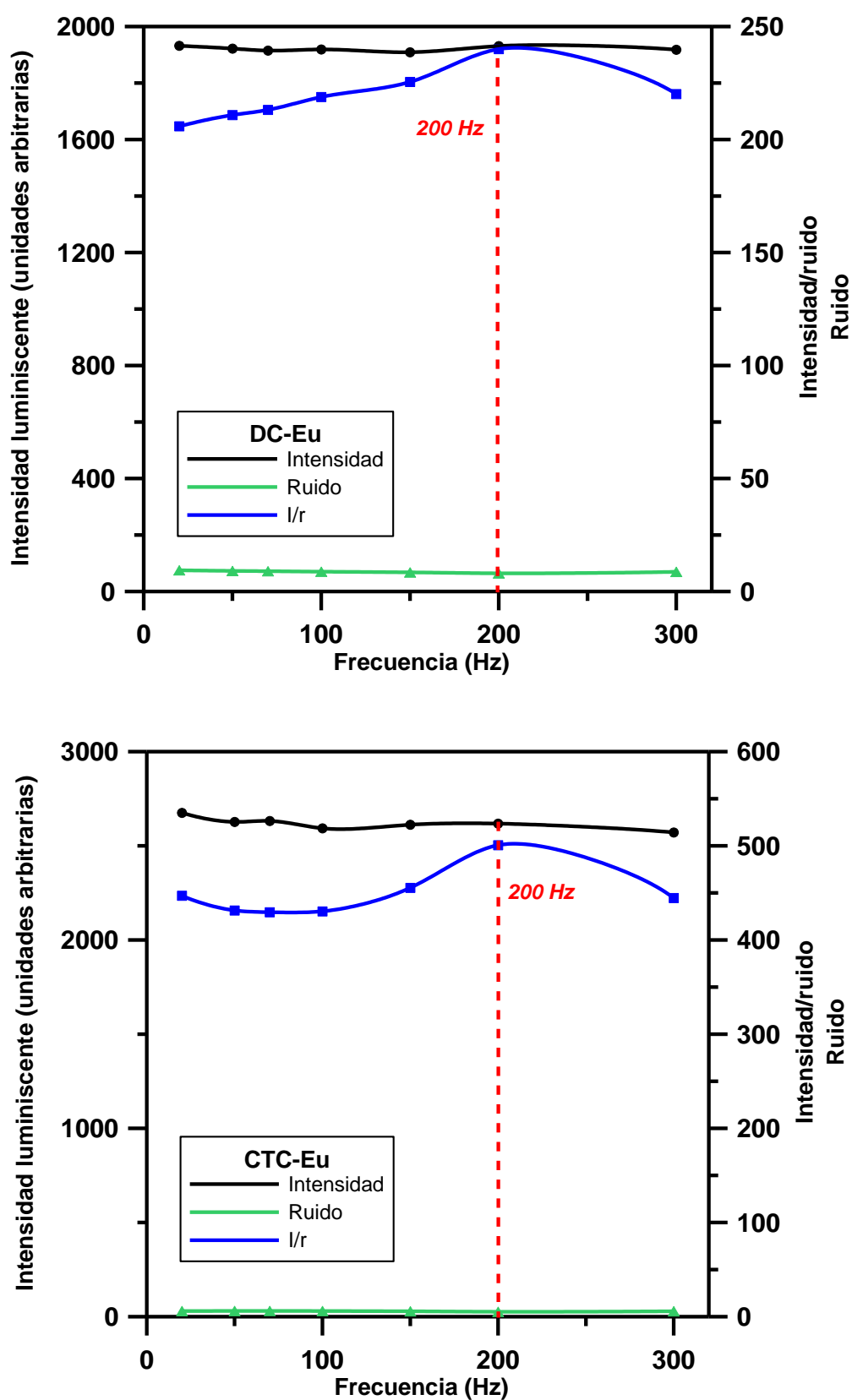


Figura 18. Influencia de la frecuencia de disparo en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

5.2.5. Optimización del número de canales

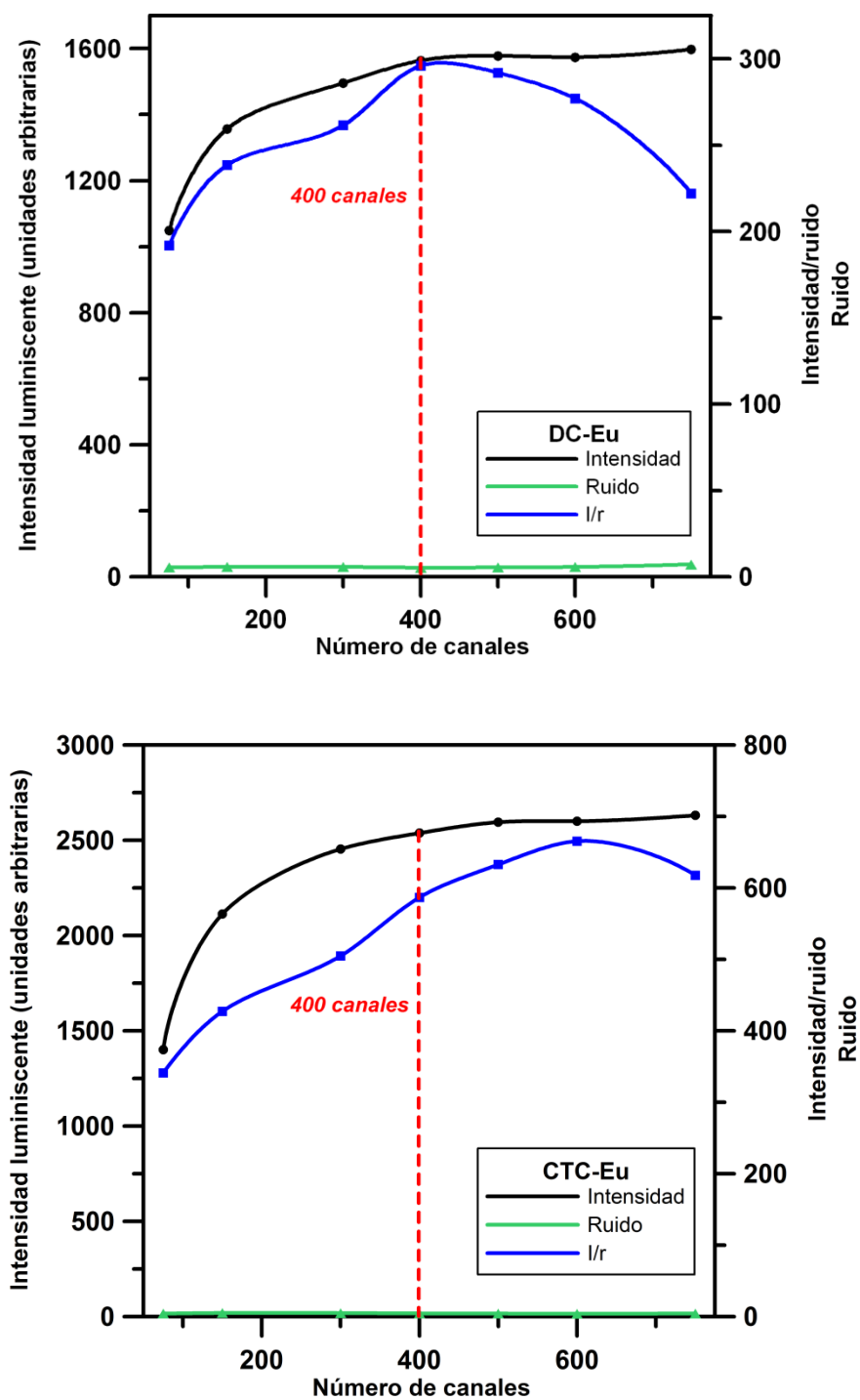


Figura 19. Influencia del número de canales en la señal luminiscente de los complejos doxiciclina-Eu (arriba) y clortetraciclina-Eu (abajo).

El número de canales es el número total de puntos que el equipo registra para cada curva de decaimiento luminiscente. Este número es independiente de cuál sea el intervalo temporal estudiado. Por tanto, cuanto menor sea este intervalo y mayor sea el número de canales utilizado, mayor resolución tendrá la curva registrada.

Se varió el número de canales entre 75 y 750 y se eligió como valor óptimo 400, ya que se trata del máximo en la curva señal/ruido para el complejo doxiciclina-europio. Además, el tiempo de registro se hacía demasiado largo para números de canales superiores.

5.2.6. *Selección del modo de adquisición*

El equipo permite realizar la adquisición de los puntos de las curvas de decaimiento de forma secuencial o aleatoria. En el primer caso, los puntos se registran en orden temporal creciente. En el segundo, el equipo va adquiriendo puntos al azar, sin seguir ningún orden concreto, hasta completar la curva. Esta última forma de adquisición es especialmente útil en moléculas que sufren fotodescomposición, ya que este efecto se reparte de igual forma a lo largo de toda la curva. Como las tetraciclinas estudiadas en este trabajo no sufren este efecto, el uso del modo aleatorio únicamente supondría una fuente de ruido instrumental. Por ello, se optó por seguir registrando las curvas de decaimiento en modo lineal.

La tabla 7 resume los valores óptimos elegidos para todas las variables estudiadas en este apartado, tanto químicas como instrumentales.

Tabla 7. Valores óptimos escogidos para todos los parámetros estudiados.

Variables químicas	
pH	8,2
[Tampón Tris]	0,10 mol L ⁻¹
[Eu]	8,80·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
[EDTA]	1,76·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
[CTACl]	0,5 %
Temperatura	20 °C
Variables instrumentales	
Tiempo de integración	70 μs
Frecuencia	200 Hz
Número de canales	400
Número de medias	5
Número de disparos	9

6. Estudio de la linealidad

Una vez se determinó cuáles eran los valores óptimos para todos los parámetros, tanto químicos como instrumentales, que influyen en la determinación de las tetraciclinas por el método propuesto, se procedió a estudiar la variación de la intensidad luminiscente con respecto a la concentración de los analitos, a fin de hallar en qué intervalo de concentraciones la respuesta era lineal. Para ello, se midieron disoluciones, en las condiciones óptimas, que contenían concentraciones crecientes de una de las tetraciclinas en presencia de europio, EDTA y CTACl. El intervalo de concentraciones estudiado estuvo comprendido entre 1,0 y 10000,0 μg L⁻¹. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos.

Asimismo, como puede observarse en la figura 21, ampliaciones de la figura 20, se encontró que para ambos complejos tetraciclina-Eu la respuesta es lineal hasta un valor de concentración de 1000,0 μg L⁻¹.

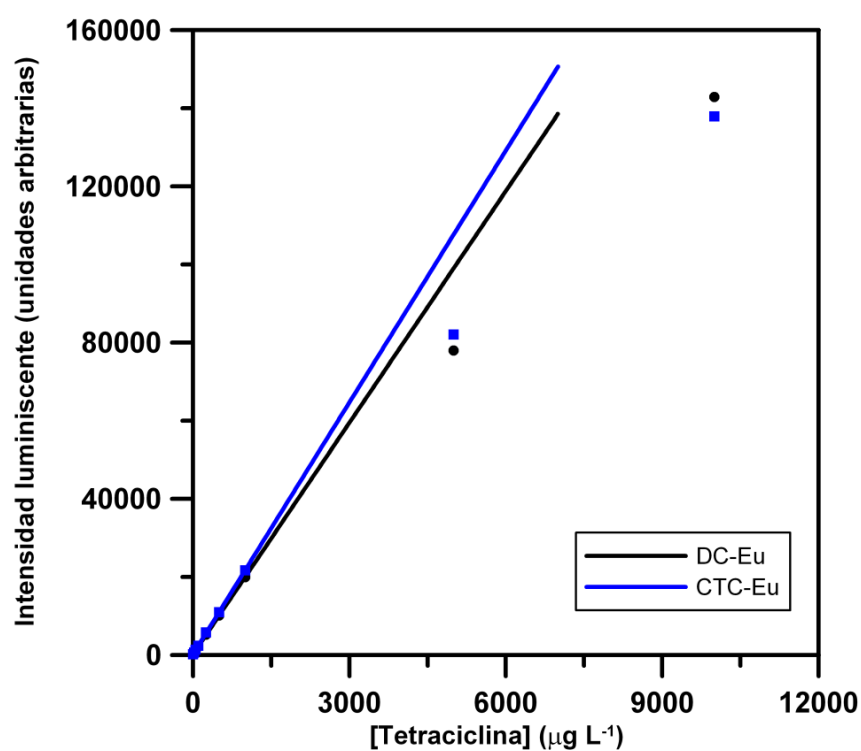
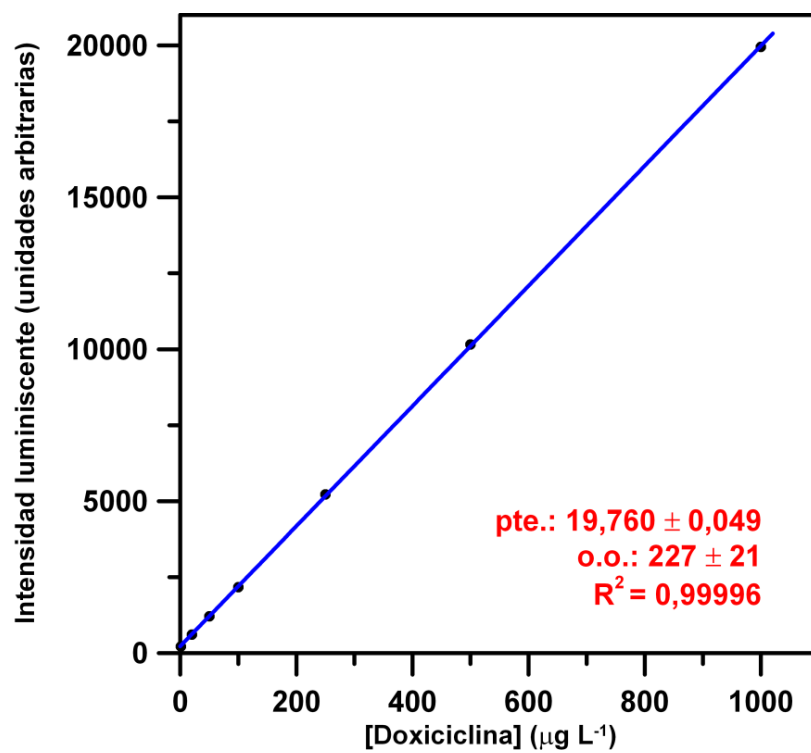


Figura 20. Estudio de linealidad entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu.



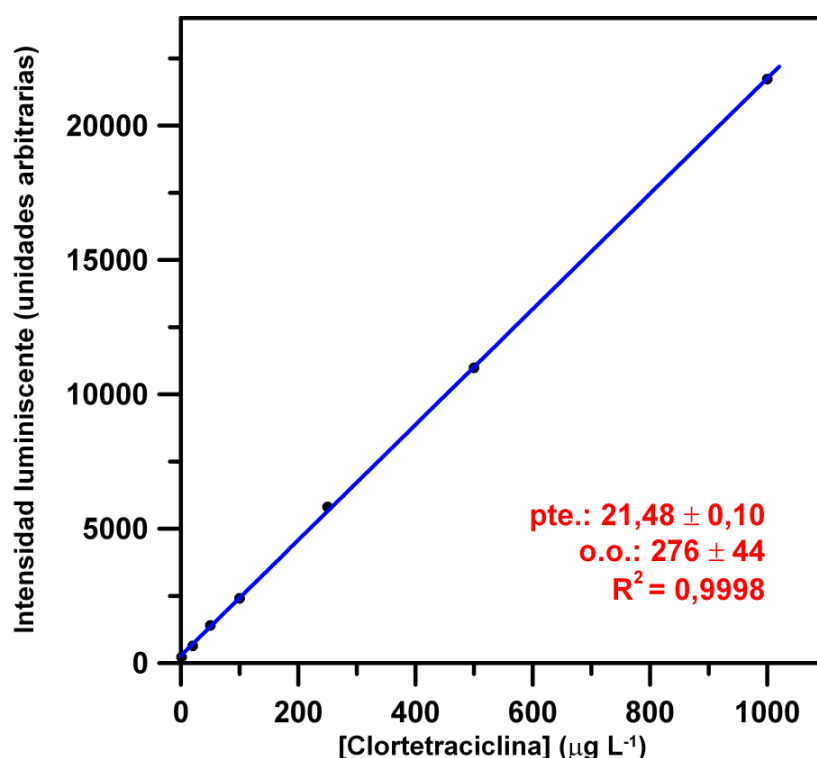


Figura 21. Rangos lineales para los complejos doxiciclina-Eu y clortetraciclina-Eu, y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

7. Aplicación del modelo PLS-1

7.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración

La matriz de calibración se construyó teniendo en cuenta los intervalos de linealidad obtenidos previamente. Se decidió estudiar una concentración máxima de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito. Para una calibración multivariante con dos componentes, el diseño más sencillo consiste en dos niveles por componente, lo cual equivale a cuatro muestras de calibración. Sin embargo, este modelo resulta en la práctica demasiado simple, ya que los resultados obtenidos no son satisfactorios debido a que el diseño utilizado fracasa a la hora de analizar muestras que contienen sólo uno de los dos componentes. Un modelo alternativo es un diseño central en forma de estrella, que cuenta sólo con cinco muestras de calibración. Dicho modelo incluye muestras con sólo

un analito, pero no mezclas de ambos componentes a altas y bajas concentraciones. Por ello, tampoco resulta ser el más adecuado.

En consecuencia, se decidió elegir una combinación de ambos modelos: un diseño factorial con dos niveles por factor combinado con un diseño central compuesto. Se decidió incluir también un tercer nivel por factor (cuatro muestras de calibración adicionales), así como un blanco analítico, con el fin de maximizar estadísticamente la información contenida en las curvas de decaimiento. Por ello, la matriz de calibración que se decidió emplear contaba finalmente con un total de catorce muestras, cuya composición aparece recogida en la tabla 8.

<i>Tabla 8. Concentraciones de los analitos en cada punto de la matriz de calibración.</i>		
Muestra	[Doxiciclina] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Clortetraciclina] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	15,0	15,0
2	15,0	50,0
3	15,0	85,0
4	50,0	15,0
5	50,0	50,0
6	50,0	85,0
7	85,0	15,0
8	85,0	50,0
9	85,0	85,0
10	50,0	0
11	50,0	100,0
12	20,0	50,0
13	100,0	50,0
14	0	0

La figura 22 ilustra esquemáticamente la matriz de calibración utilizada.

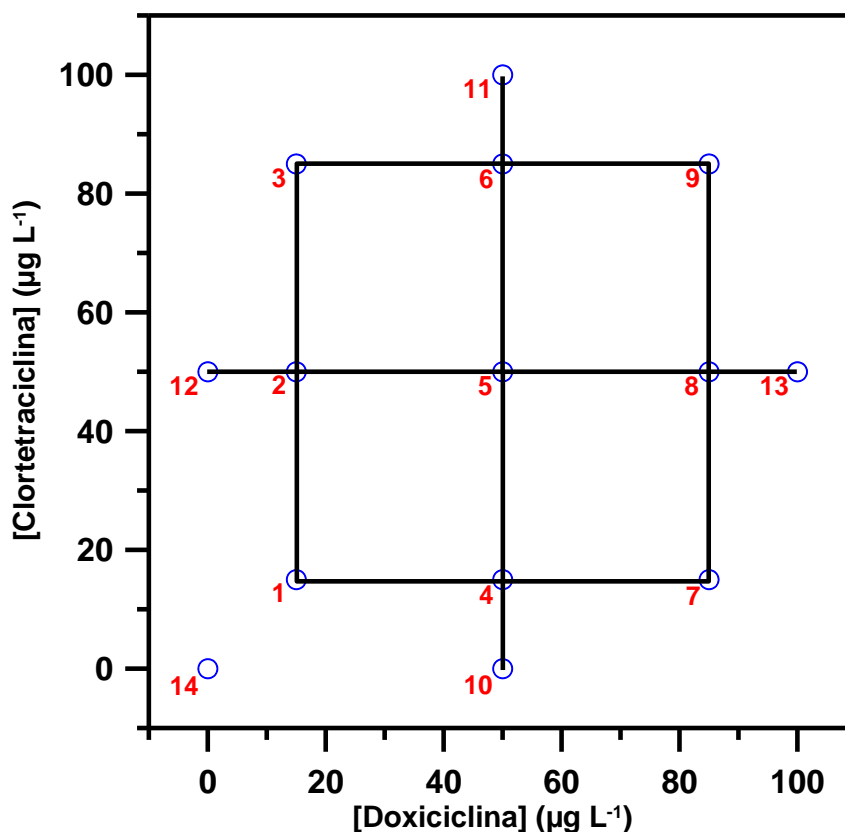


Figura 22. Representación gráfica de la combinación de diseños empleada en la matriz de calibración.

Se prepararon las catorce muestras indicadas en la tabla 8 y se registraron sus curvas de decaimiento luminiscente en las condiciones químicas e instrumentales óptimas que se indicaron anteriormente. Dichas curvas, que se muestran en la figura 23, se exportaron a archivos de texto, con el fin de poder trabajar con ellas usando la subrutina MVC-1 de Matlab [252]. El estudio de técnicas de calibración multivariante utilizando datos tanto espectrofotométricos como fluorimétricos muestra que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante los modelos de regresión PCR y PLS, si bien Thomas y Haaland [274] recomiendan este último algoritmo por sus ventajas teóricas y sus óptimos resultados en un rango de condiciones mucho más amplio. Por ello, el algoritmo PLS-1 fue el utilizado en este trabajo.

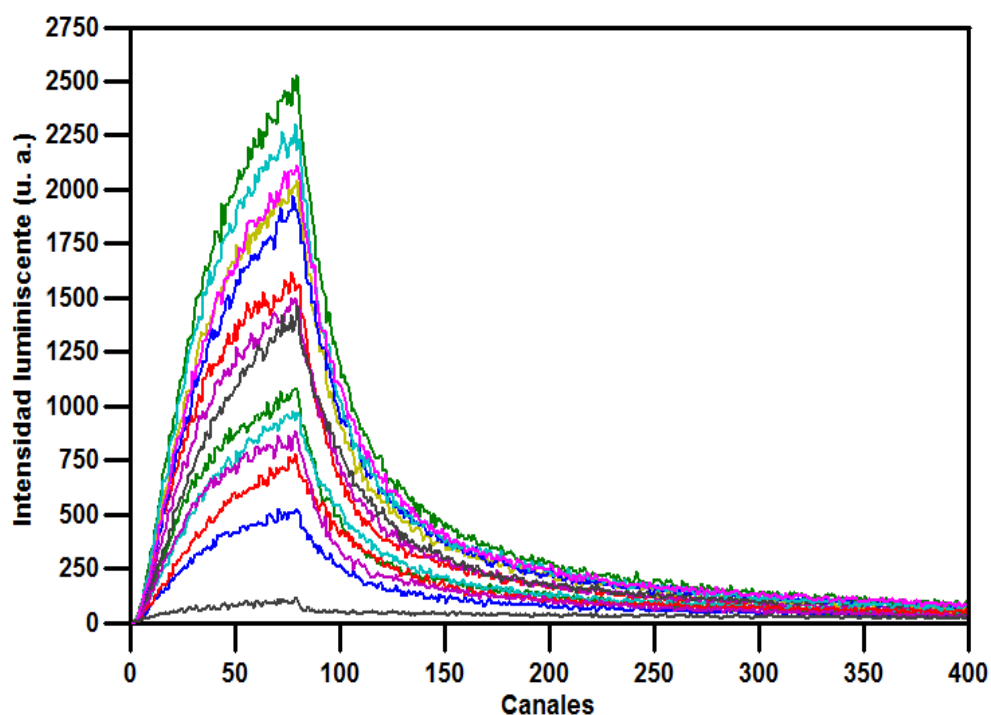


Figura 23. Curvas de decaimiento de las catorce muestras que constituyen la matriz de calibración del modelo PLS.

La optimización de los datos de la matriz de calibración implica el estudio del intervalo temporal, del número de factores y de la posible presencia de puntos discrepantes.

7.1.1. Intervalo temporal óptimo

Aunque la calibración multivariante es un método que permite trabajar con todo el espectro o curva experimental, es conveniente realizar un estudio para determinar si esto es conveniente, puesto que a veces pueden darse problemas de sobreajuste si el número de variables es muy elevado, de la misma forma que pueden aparecer problemas de falta de ajuste si el número de variables es escaso. Por ello, se realizaron calibraciones a diferentes intervalos temporales, con el fin de detectar y eliminar posibles regiones de las curvas de decaimiento que no contuvieran información

relevante acerca de los analitos en estudio y, por tanto, que pudieran influenciar de forma negativa los resultados obtenidos al aplicar el modelo matemático. El estudio de cada una de estas regiones temporales se llevó a cabo mediante la comparación de los coeficientes de determinación (R^2) que se obtienen tras efectuar las validaciones cruzadas, método consistente en un conjunto de análisis sucesivos durante el cual el programa va dejando fuera una muestra en cada análisis y calcula su valor utilizando el resto de muestras.

Se observó que los mejores resultados para el análisis de doxiciclina se obtenían cuando se usaba la curva de decaimiento completa. Sin embargo, para la clortetraciclina lo más conveniente resultó ser el análisis entre los canales 1 y 110, únicamente.

7.1.2. Número de factores óptimo

A continuación, se realizó la optimización del número de factores para cada analito mediante el método de validaciones cruzadas. Para encontrar el número mínimo de factores que permita construir un modelo sin sobreajustes, inicialmente se introdujo en la subrutina de Matlab un valor de seis factores, que, previsiblemente, será mayor que el necesario, puesto que el número de factores óptimo suele coincidir con el número de componentes de la mezcla.

El criterio que se aplicó en este trabajo (recomendado por Haaland y Thomas [238]) considera como número óptimo de factores aquél por el cual la probabilidad para la razón $F(P)$ es igual o menor que 0,75. Se obtuvo un valor de dos factores tanto para la doxiciclina como para la clortetraciclina, tal y como se esperaba de una mezcla binaria. Los resultados de estos estudios se hallan recogidos en las tablas 9 y 10.

*Tabla 9. Optimización del número de factores
(canales del 1 al 150 para la doxiciclina y del 1 al 110 para la clortetraciclina).*

	Doxiciclina			Clortetraciclina		
Número de factores	PRESS	F	P	PRESS	F	P
0	17015	351,95	0,999	17015	452,64	0,999
1	9123,3	188,71	0,999	6361,3	169,22	0,999
2	48,346	1	0,499	37,59	1	0,499
3	57,628	0	0	44,89	0	0
4	56,851	0	0	47,44	0	0
5	58,169	0	0	48,72	0	0
6	57,944	0	0	48,89	0	0

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R²
Doxiciclina	2	1,9	4,0	0,997
Clortetraciclina	2	1,6	3,5	0,997

7.1.3. Datos discrepantes

La presencia de puntos discrepantes en la matriz de calibración puede afectar en gran medida a la precisión del método. Por ello, si existen, es necesario eliminarlos antes de proceder con la etapa de validación. Se vio que los valores de la razón F eran siempre inferiores a la unidad, por lo que, en este caso, no se encontraron puntos discrepantes [238] para un número de factores de dos, ni en el caso de la doxiciclina, ni en el de la clortetraciclina, por lo que se continuó el proceso con la etapa de validación del método.

7.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)

Utilizando un programa de generación de números aleatorios [253], se eligieron diez muestras que contuvieran diferentes valores de concentraciones de doxiciclina y de clortetraciclina, siempre comprendidos dentro de los intervalos de calibración utilizados anteriormente. Las diez muestras se registraron en las condiciones optimizadas, obteniéndose las curvas de la figura 24.

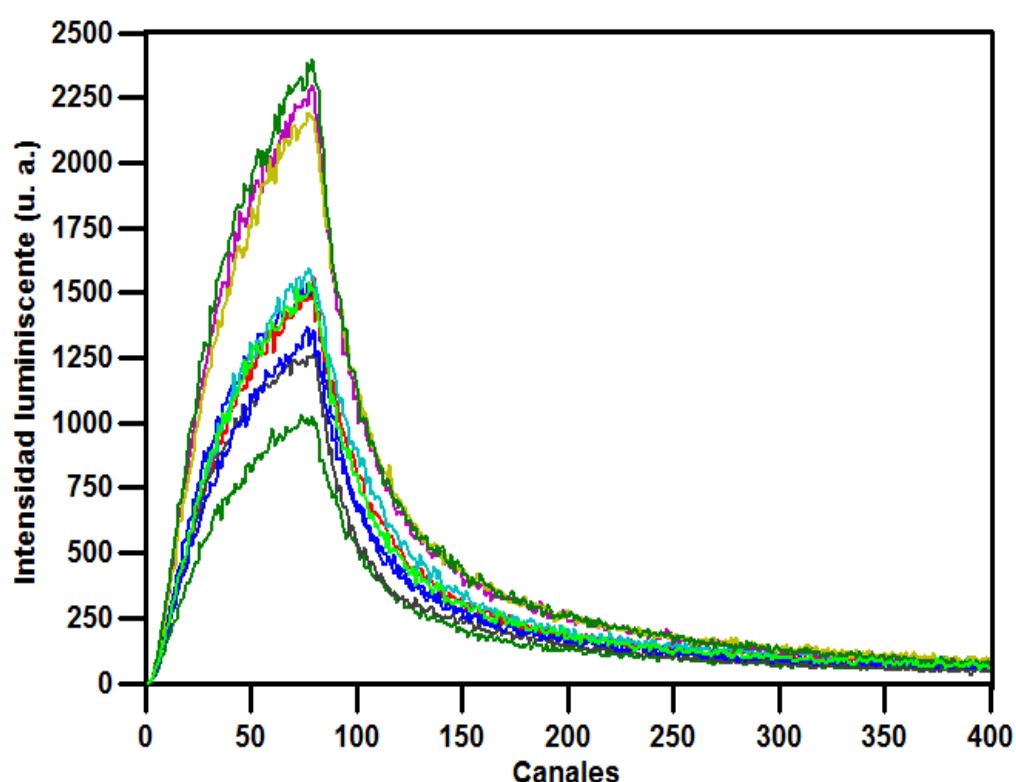


Figura 24. Curvas de decaimiento luminiscente de las muestras utilizadas en el proceso de validación del modelo PLS.

Las diez curvas se exportaron como archivos de texto, y se utilizó la matriz de calibración desarrollada previamente para la predicción del contenido en tetraciclinas de cada una de ellas. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Predicción del contenido en doxiciclina de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	30,0	31,16	0,84	2,7	103,9
2	37,0	37,27	0,75	3,3	100,7
3	80,0	80,00	0,99	3,0	100,0
4	96,0	94,2	1,1	3,1	98,2
5	72,0	72,1	1,0	2,2	100,0
6	99,0	98,8	1,2	2,5	99,8
7	16,0	16,58	0,83	2,9	96,4
8	59,0	58,96	0,81	3,0	100,0
9	67,0	69,1	1,2	2,4	103,1
10	63,0	63,95	0,86	2,9	101,5

Tabla 12. Predicción del contenido en clortetraciclina de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	71,0	67,5	1,2	1,8	95,1
2	31,0	30,6	1,1	2,4	98,7
3	28,0	27,4	1,5	2,1	97,9
4	22,0	21,7	1,6	2,0	98,8
5	96,0	84,2	1,5	1,4	97,9
6	60,0	58,7	1,8	1,8	97,8
7	67,0	65,2	1,2	2,0	97,2
8	35,0	34,0	1,2	2,0	97,1
9	93,0	93,8	1,8	1,7	100,1
10	41,0	41,8	1,2	1,9	101,1

Como puede verse, en todos los casos el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra próximo al 100 %. Asimismo, se obtuvo una tendencia marcadamente lineal cuando se representaron las concentraciones de los analitos que el modelo PLS predice frente a las concentraciones añadidas, tal y como muestra la figura 25.

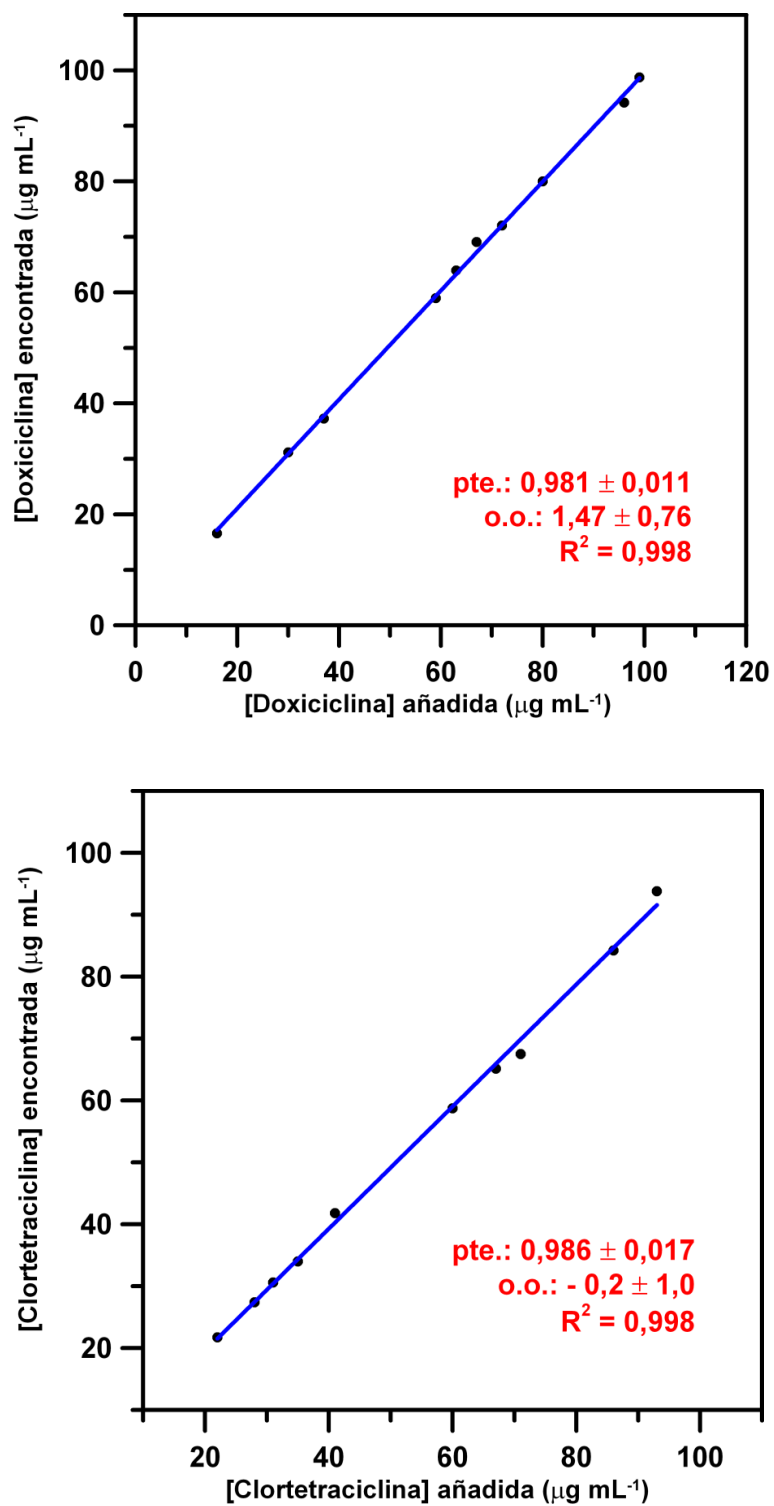


Figura 25. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS frente a las añadidas, para el análisis de doxiciclina (arriba) y de clortetraciclina (abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

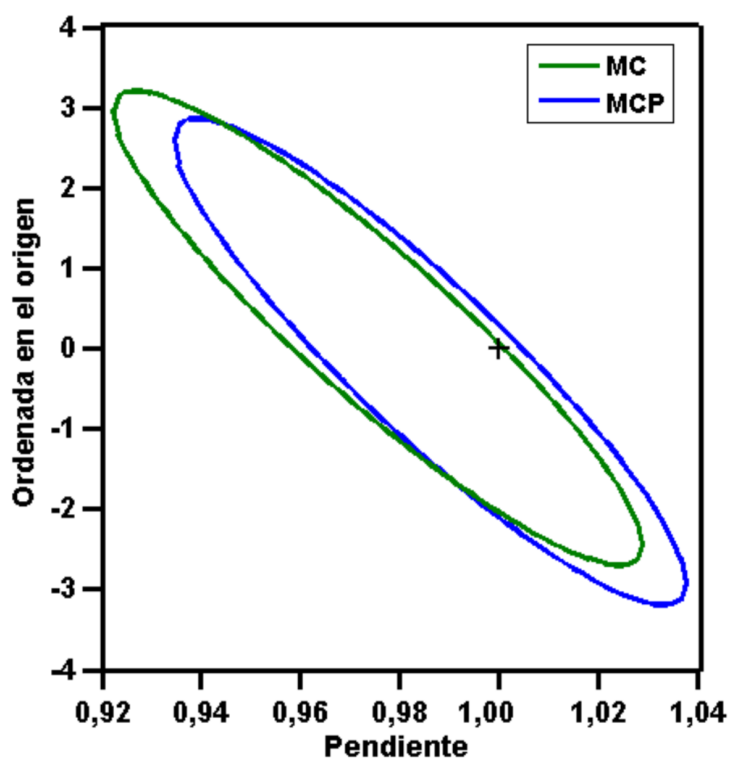
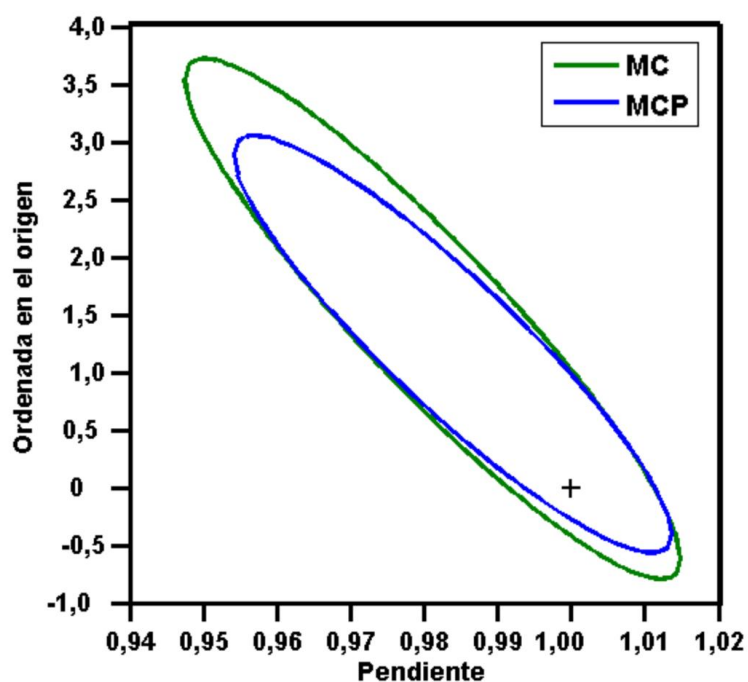


Figura 26. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para doxiciclina (arriba) y clortetraciclina (abajo) en agua, considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (azul).

Evidentemente, las rectas obtenidas al representar los valores de concentración encontrada frente a concentración añadida deben tener como pendiente la unidad y como ordenada en el origen 0. En la figura 26 se observa cómo dicho punto se encuentra, para ambos analitos, dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando la pendiente y la ordenada en el origen y sus desviaciones estándar correspondientes, tanto en una regresión mediante mínimos cuadrados (en verde), como en una mediante mínimos cuadrados ponderados (en azul), a un nivel de confianza del 95%. Se recomienda este análisis [275] para comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos reales y los calculados por el modelo.

8. Estudio de los límites de detección

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un nuevo criterio para calcular el límite de detección de un método de calibración multivariante [224, 276]. Este criterio se basa en la definición de la IUPAC [240], que considera únicamente la desviación estándar del blanco (S_b) y la pendiente de la recta de calibrado (b) para el cálculo del límite de detección (LD).

Análogamente, para calcular el límite de detección nuestro criterio considera la desviación estándar de diez replicados del blanco analítico y la pendiente de la recta que relaciona las concentraciones de analito encontradas y las añadidas mediante la metodología de calibración multivariante. Como ya se ha comentado, la pendiente de dicha recta está siempre muy próxima a la unidad, si no hay errores. Sin embargo, siempre que los replicados del blanco se predigan mediante la metodología PLS, la sensibilidad analítica y los errores estadísticos asociados a la ordenada en el origen se encuentran ya incluidos en la desviación estándar.

En la tabla 13 se recogen, para cada uno de los analitos, la desviación estándar de los diez replicados del blanco (S_b), la pendiente de la recta concentraciones encontradas-concentraciones añadidas (b) y el límite de detección (LD) calculado. Los valores obtenidos son los esperados en determinaciones de tetraciclinas basadas en luminiscencia sensibilizada con europio [19].

Tabla 13. Cálculo de los límites de detección (LD).

Analito	S_b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	b	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Doxiciclina	0,30	0,98	3,27
Clortetraciclina	0,93	0,99	1,06

9. Estudio de la precisión del método

Con el fin de llevar a cabo un estudio de la precisión del método propuesto, se preparó una serie de diez replicados de una disolución que contenía $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de doxiciclina y la misma concentración de clortetraciclina. Se registraron las curvas de decaimiento de las diez disoluciones en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, y a continuación se predijo su contenido en tetraciclinas introduciendo las disoluciones en el modelo como muestras desconocidas.

Tabla 14. Predicción de diez replicados de una muestra que contenía $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ tanto de doxiciclina como de clortetraciclina.

Muestra	[Doxiciclina] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Clortetraciclina] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	48,16	51,5
2	50,82	49,3
3	51,26	48,2
4	50,46	50,0
5	49,54	51,1
6	49,43	50,8
7	49,49	50,4
8	50,15	49,8
9	49,31	50,7
10	48,85	51,3
Media	49,75	50,3
Desv.Est.	0,93	1,0

Como detalla la tabla 14, las concentraciones medias estimadas fueron $49,75 \pm 0,93$ y $50,3 \pm 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, para la doxiciclina y la clortetraciclina, respectivamente, lo cual indica la enorme precisión del método desarrollado.

10. Aplicaciones del método propuesto

10.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas

Para evaluar la posible aplicabilidad del método propuesto a muestras reales, se adquirieron tres preparaciones farmacéuticas que contuvieran uno de los analitos (bien doxiciclina, bien clortetraciclina), ya que no se encontraron medicamentos que incluyeran en su composición ambas tetraciclinas simultáneamente. El procedimiento que se siguió con cada una de estas preparaciones farmacéuticas fue el siguiente:

- **Doxitén enzimático** (Teofarma, Valle Salimbene, Italia) se vende en forma de cápsulas de 100 mg de doxiciclina. El contenido completo de una de ellas se disolvió en agua y a continuación se filtró utilizando el papel de filtro para análisis cuantitativo DP 145 125 (Albet). La disolución filtrada se introdujo en un matraz aforado de un litro y se enrasó con agua destilada, obteniéndose una disolución de doxiciclina de 100 mg L^{-1} .
- Exactamente el mismo procedimiento se siguió con **Doxiciclina Normon** (Genéricos Normon, Madrid), que se vende en pastillas de 100 mg de doxiciclina.
- Por último, **Oftalmolosa Cusí Aureomicina** (Alcon Cusí, El Masnou, Barcelona) es un ungüento oftalmológico que contiene 5 mg de clortetraciclina por gramo. Se pesó un gramo y se disolvió en agua templada (30°C). A continuación, se filtró utilizando el papel de filtro anteriormente indicado y se llevó a un litro con agua destilada. La disolución resultante contenía 50 mg L^{-1} de clortetraciclina.

Se prepararon tres muestras diferentes de cada una de estas medicinas, y a continuación se diluyeron, con el fin de que las concentraciones de los analitos estuvieran incluidas en el intervalo lineal del método desarrollado. Se analizaron tanto muestras que contenían sólo uno de los analitos, como muestras que contenían ambos (preparadas adicionando cantidades adecuadas de un patrón de la tetraciclina que no estuviera presente en la composición del medicamento correspondiente). Las disoluciones resultantes se midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas y se calculó las concentraciones de los analitos en cada muestra mediante PLS.

Los resultados de estas mediciones, expresados como porcentaje de recuperación medio de los tres replicados de cada muestra analizados se encuentran resumidos en la tabla 15. Los porcentajes de recuperación globales ($99,4 \pm 1,8\%$ y $100,5 \pm 2,1\%$ para doxiciclina y clortetraciclina, respectivamente) concuerdan con el contenido nominal de los analitos en las preparaciones farmacéuticas, y la precisión obtenida es muy satisfactoria.

Tabla 15. Resultados del análisis de muestras de preparaciones farmacéuticas que contenían doxiciclina y/o clortetraciclina.

Preparación Farmacéutica	[Analito] nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)	
	DC	CTC	DC	CTC	DC	CTC	DC	CTC
Doxitén enzimático	70,0	-	-	-	69,6	-	99,4	-
	70,0	-	-	70,0	71,0	70,6	101,5	100,8
Doxiciclina Normon	90,0	-	-	-	90,7	-	100,8	-
	60,0	-	-	55,0	58,9	53,8	98,1	97,8
Aureomicina	-	80,0	-	-	-	80,4	-	100,5
	-	80,0	90,0	-	87,5	82,3	97,3	102,9

10.2. Aplicación a muestras de orina humana

Tres personas sanas y que no consumían ningún tipo de medicamento se ofrecieron voluntarias para proporcionar muestras de orina. Dichas muestras se tomaron por la mañana temprano, cuando los voluntarios aún estaban en ayunas, se centrifugaron inmediatamente durante quince minutos y los sobrenadantes se diluyeron con agua destilada.

Se prepararon y analizaron muestras sintéticas que contenían orina y diferentes concentraciones de los dos analitos de interés. Los factores de dilución en la orina se fijaron con el fin de que las concentraciones de las tetraciclinas que normalmente se espera encontrar en muestras reales de pacientes que hayan consumido algún medicamento que las contuviera se encontraran incluidas en el intervalo lineal escogido para el desarrollo de la metodología PLS.

Si bien la orina humana no presenta fluorescencia nativa a las longitudes de onda utilizadas en este trabajo [277], su presencia dio lugar a una señal de fondo y, por tanto, a interferencias en la determinación de doxiciclina y clortetraciclina utilizando el diseño factorial descrito anteriormente, debido a lo cual no se pudo obtener predicciones completamente satisfactorias. Por ello se pensó en desarrollar otro diseño diferente, el cual sí incluyera en el modelo matemático la influencia de la presencia de orina.

Concretamente, se seleccionó un diseño central compuesto para tres componentes. La nueva matriz de calibración obtenida con este método contenía quince muestras estándar, a las cuales se añadió un blanco analítico. Las concentraciones para ambas tetraciclinas en este caso se variaron entre 0 y 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, y las diluciones de orina entre 1/105,8 y 1/500,0, tal y como muestra la tabla 16. Asimismo, una representación esquemática de este nuevo modelo puede observarse en la figura 27.

Tabla 16. Concentraciones de los analitos y diluciones de orina en cada punto de la matriz de calibración.

Muestra	[Doxiciclina] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Clortetraciclina] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Orina (dilución)
1	21,0	21,0	105,8
2	21,0	21,0	392,2
3	21,0	79,0	105,8
4	21,0	79,0	392,2
5	79,0	21,0	105,8
6	79,0	21,0	392,2
7	79,0	79,0	105,8
8	79,0	79,0	392,2
9	0	50,0	250,0
10	100,0	50,0	250,0
11	50,0	0	250,0
12	50,0	100,0	250,0
13	50,0	50,0	0
14	50,0	50,0	500,0
15	50,0	50,0	250,0
16	0	0	250,0

Todas las muestras de esta matriz de calibración se analizaron utilizando las condiciones químicas e instrumentales óptimas, obteniéndose las curvas de decaimiento luminiscente que se muestran en la figura 28. Como se observó que los resultados obtenidos mejoraban aumentando el número de replicados del blanco que se incluía en el modelo, finalmente el modelo contó con once blancos analíticos.

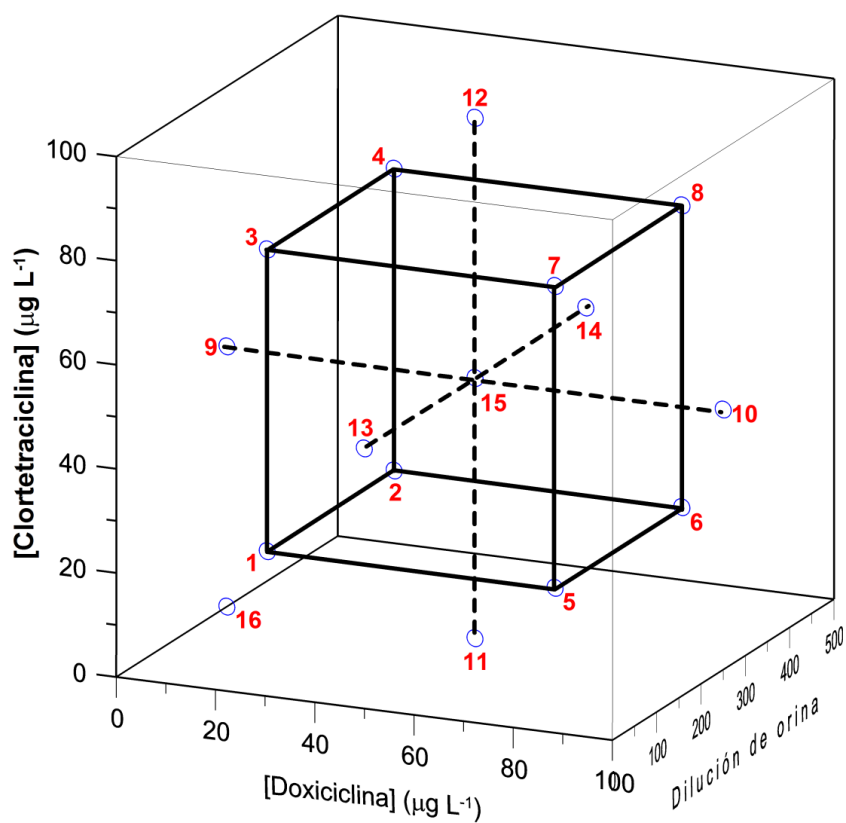


Figura 27. Representación gráfica del diseño central compuesto empleado en la matriz de calibración con orina.

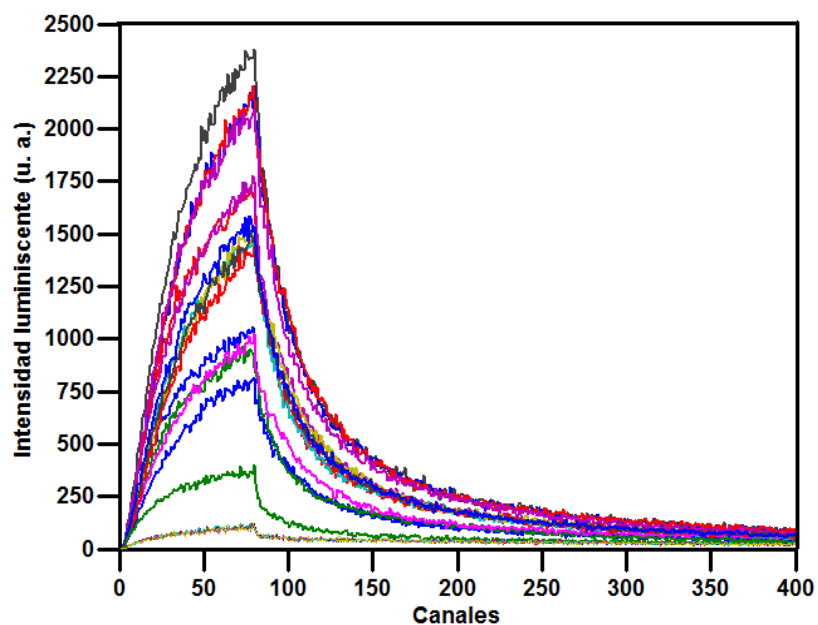


Figura 28. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración para la determinación de doxiciclina y clortetraciclina en orina.

Las curvas se exportaron como archivos de texto y se trataron con el algoritmo PLS-1 [274] de la rutina MVC-1 de Matlab [252]. El número de factores óptimo obtenido en este caso fue tres para ambos analitos, lo cual era de esperar, ya que se trata de una mezcla ternaria (las dos tetraciclinas y la orina). Los mejores resultados se obtuvieron con el intervalo 80 - 121 para la doxiciclina y 79 - 125 para la clortetraciclina, y no se encontraron puntos discrepantes [238]. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante en orina.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R²
Doxiciclina	3	4,3	16	0,98
Clortetraciclina	3	5,4	19	0,97

Para validar la matriz de calibración, se analizó un conjunto de siete muestras sintéticas con concentraciones de ambas tetraciclinas y diluciones de orina que se variaron aleatoriamente [253], pero siempre dentro de los intervalos de calibración.

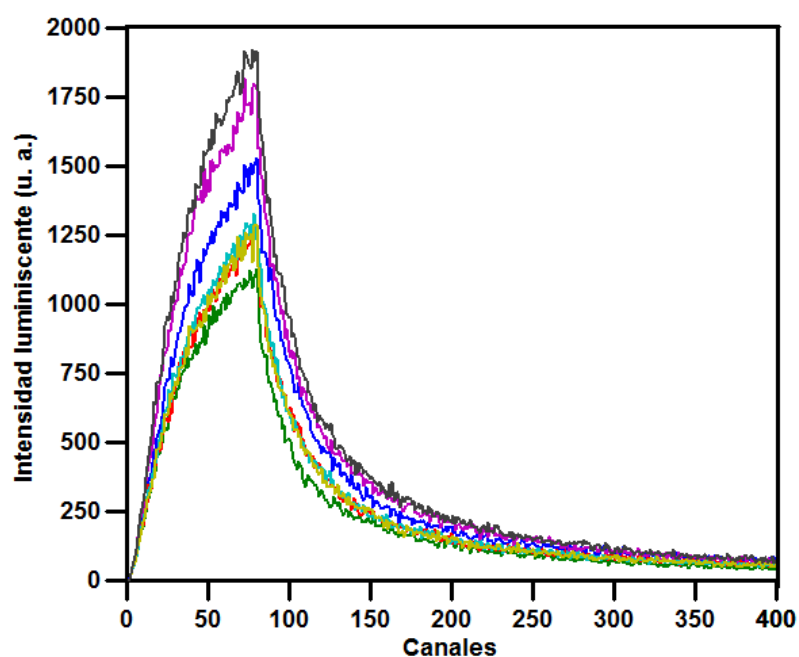


Figura 29. Curvas de decaimiento de las muestras de validación para la determinación de doxiciclina y clortetraciclina en orina.

Las siete curvas de validación aparecen representadas en la figura 29, y en las tablas 18 y 19 puede verse un resumen de los resultados obtenidos en la etapa de validación.

Tabla 18. Predicción del contenido en doxiciclina de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	66,0	66,3	4,5	2,2	100,4
2	28,0	27,2	3,2	2,5	97,0
3	50,0	50,8	3,5	2,4	101,7
4	29,0	29,1	3,2	2,0	100,2
5	65,0	63,3	4,5	2,2	97,3
6	57,0	50,8	2,6	1,8	89,1
7	77,0	72,2	4,4	1,8	93,7

Tabla 19. Predicción del contenido en clortetraciclina de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	38,0	37,2	5,6	2,1	97,8
2	42,0	40,7	4,1	2,5	96,9
3	31,0	28,0	4,3	2,3	90,3
4	51,0	54,2	5,0	2,4	106,2
5	52,0	51,0	5,8	2,2	98,1
6	25,0	24,5	3,5	1,8	98,0
7	58,0	56,4	5,5	1,8	97,2

La exactitud en la predicción es ligeramente inferior a la del modelo desarrollado en ausencia de orina, pero aun así puede observarse que en todos los casos el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra próximo al 100 %. Asimismo, se obtuvo una

tendencia lineal cuando se representaron las concentraciones de los analitos que el modelo PLS predice frente a las concentraciones añadidas, tal y como puede verse en la figura 30.

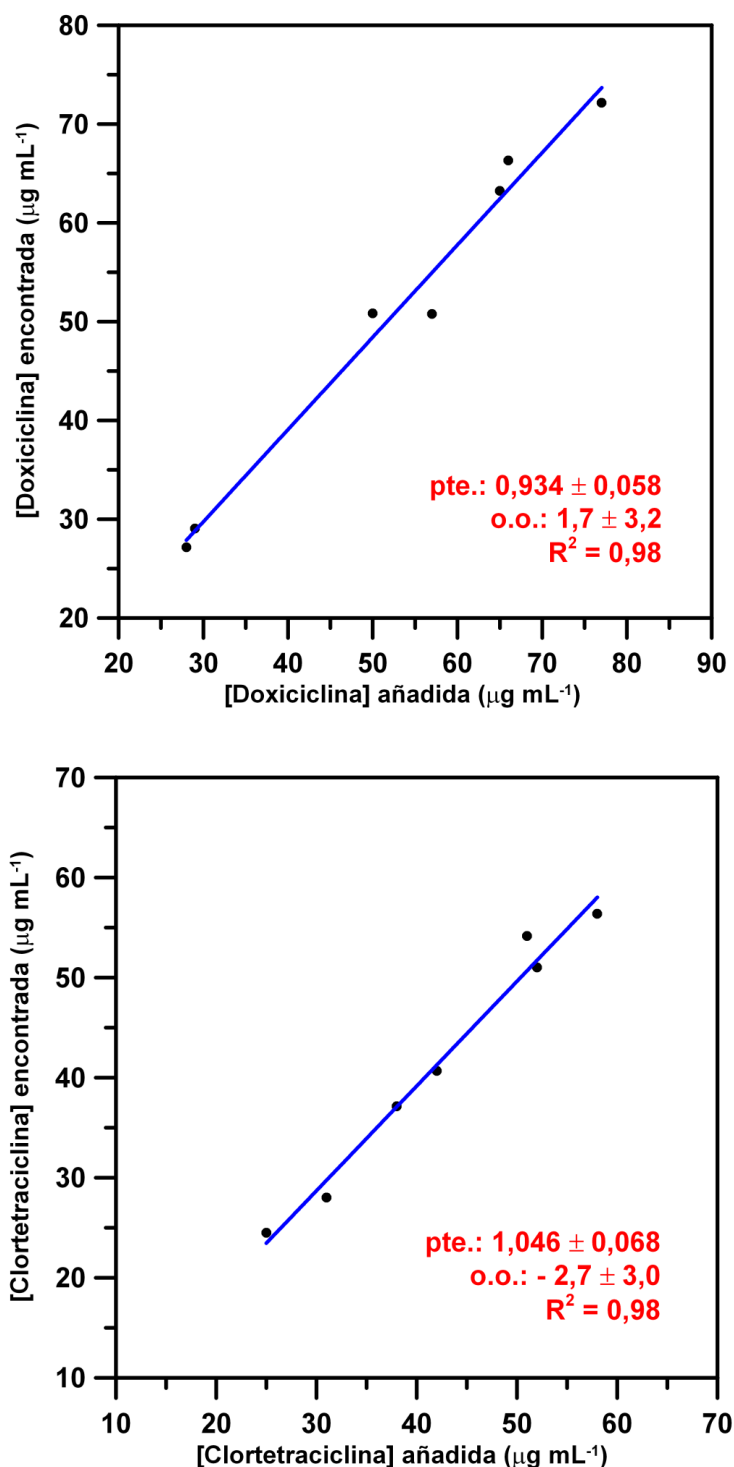


Figura 30. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS frente a las añadidas para doxiciclina (arriba) y clortetraciclina (abajo) en orina, y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

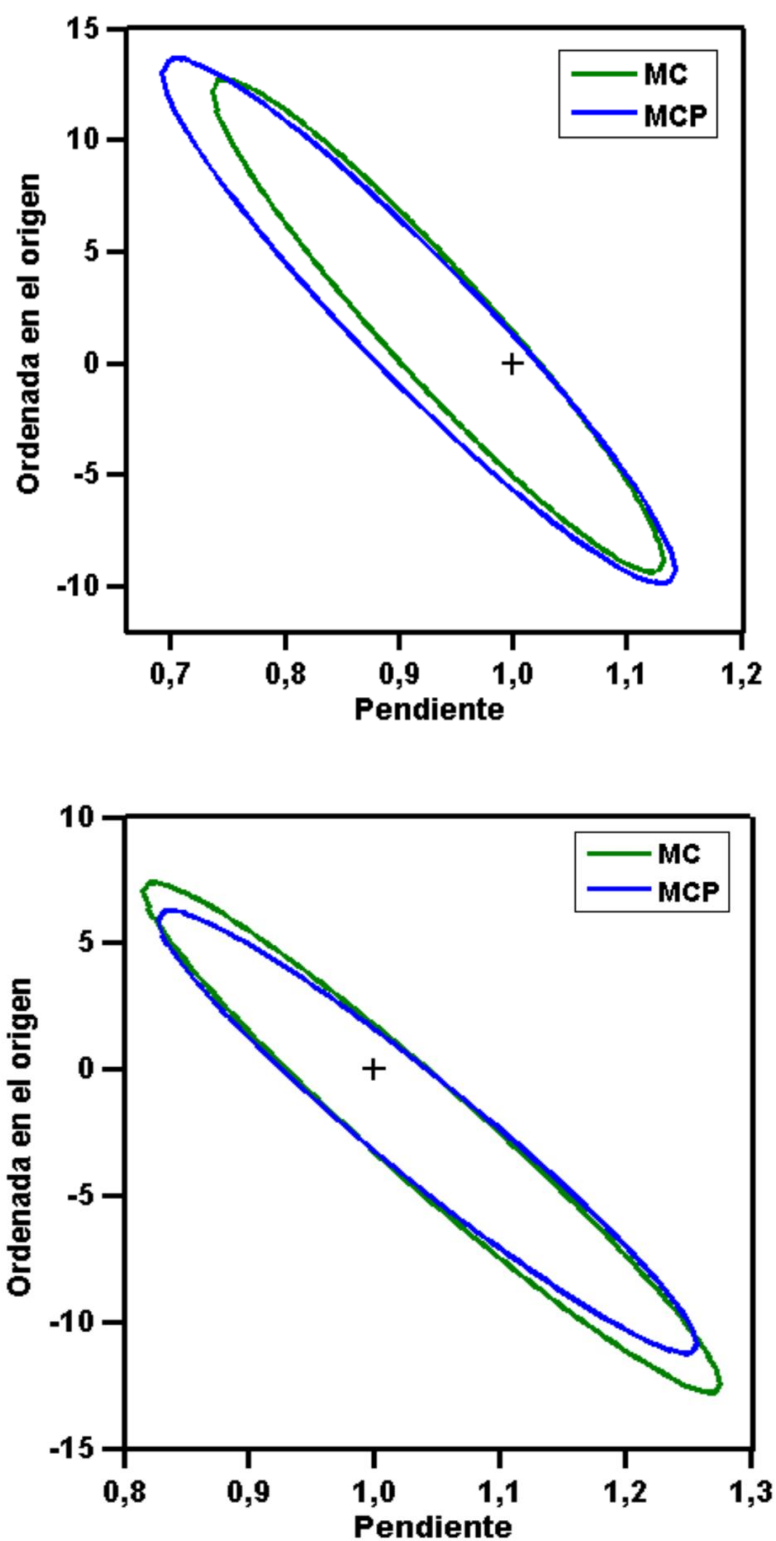


Figura 31. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para doxiciclina (arriba) y clortetraciclina (abajo) en orina, considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (azul).

Además, la figura 31 muestra que el punto pendiente unidad y ordenada en el origen cero se encuentra, para ambos analitos, dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando la pendiente y la ordenada en el origen, así como sus desviaciones estándar correspondientes, tanto en una regresión mediante mínimos cuadrados (en verde), como en una mediante mínimos cuadrados ponderados (en azul). Este hecho indica, como ya se comentó, que las diferencias entre las concentraciones añadidas y las predichas no son estadísticamente significativas al nivel de confianza elegido (en este caso, un 95%) [275].

Por último, se registraron y predijeron como muestras desconocidas diez blancos analíticos, con el fin de calcular el límite de detección del método en orina. Se utilizó de nuevo el criterio desarrollado por nuestro grupo de investigación para el cálculo del límite de detección de un método de calibración multivariante [224, 276].

La tabla 20 muestra, para ambos analitos, la desviación estándar de los diez replicados del blanco con orina (S_b), la pendiente de la recta concentraciones encontradas-concentraciones añadidas (b) y el límite de detección (LD) calculado. Como puede verse, el límite de detección de la doxiciclina es similar al obtenido en ausencia de orina. En el caso de la clortetraciclina, el límite de detección calculado es más alto que el obtenido para muestras sin orina, pero aún adecuado para la determinación de este compuesto con elevada sensibilidad.

Tabla 20. Cálculo de los límites de detección en muestras de orina (LD).

Analito	S_b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	B	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Doxiciclina	1,1	0,9	3,7
Clortetraciclina	2,2	1,0	6,6

CAPÍTULO V

DETERMINACIONES BINARIAS DE FENAMATOS MEDIANTE LUMINISCENCIA SENSIBILIZADA POR TERBIO

Abstract

In this chapter, a simple luminescent methodology for the simultaneous determination of two binary mixtures of fenamates in pharmaceutical preparations and human urine is proposed. Since the native fluorescence of the analytes is not intense, the method takes advantage of the lanthanide-sensitized luminescence, which provides a higher sensitivity. Due to the strong overlapping between the luminescence spectra of both terbium complexes, the use of luminescence decay curves to resolve mixtures of the analytes is proposed, since these curves are more selective.

For the simultaneous analysis of mefenamic and flufenamic acid, a factorial design with two levels per factor coupled to a central composite design was selected to obtain a calibration matrix of thirteen standards plus three blank samples that was processed using a partial least-squares (PLS) algorithm. In order to assess the goodness of the proposed method, a prediction set of synthetic samples was analyzed, obtaining recuperation percentages between 96 and 106 %. Limits of detection, calculated by means of a new criterion, were $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and $14.61 \mu\text{g L}^{-1}$ for flufenamic and mefenamic acids, respectively.

To determinate mefenamic and tolafenamic acids simultaneously, the calibration matrix consisted of thirteen standards plus eight blank samples. The analysis of the prediction set of synthetic samples yielded recovery percentages between 90 and 104 %, while limits of detection were $14.9 \mu\text{g L}^{-1}$ and $15.9 \mu\text{g L}^{-1}$ for tolafenamic and mefenamic acids, respectively.

Both methods were tested in pharmaceutical preparations containing fenamates, obtaining recovery percentages close to 100%. Finally, the simultaneous determination of both mixtures of fenamates in human urine samples was successfully carried out by means of a correction of the above-explained model, validated by an analysis of variance. No extraction method neither prior separation of the analytes were needed.

1. Generalidades

Se propone en este capítulo la determinación simultánea de fenamatos en mezclas binarias, tanto en agua como en orina. Los fenamatos son fármacos derivados del ácido antranílico que pertenecen a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos.

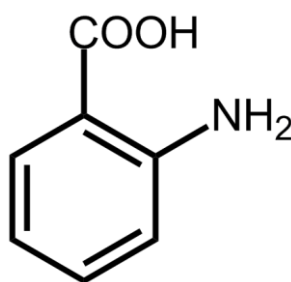


Figura 1. Estructura química del ácido antranílico.

Concretamente, en este capítulo se determinan los siguientes fenamatos:

- **Ácido mefenámico (AM):** actúa como analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Impide la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición no competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa, encargada de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas. El ácido mefenámico está indicado en tratamientos de procesos dolorosos, manifestaciones inflamatorias y estados febriles de cualquier tipo, dismenorrea y menorragia, artritis reumatoide y gota aguda o crónica. Se administra vía oral y se elimina principalmente en la orina, teniendo una semivida de entre dos y tres horas.

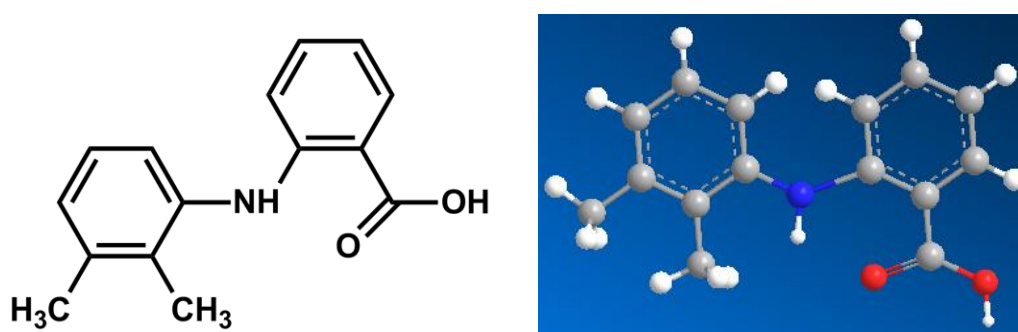


Figura 2. Estructura química en dos y tres dimensiones del ácido mefenámico.

- **Ácido flufenámico (AF):** analgésico, antiinflamatorio y favorecedor del metabolismo del tejido conjuntivo, está indicado en enfermedades reumáticas agudas y crónicas, traumatismos, síndrome cervical, lumbago, epicondilitis, tendosinovitis, miositis y fibrositis, así como coadyuvante en fisioterapia. Se administra como comprimido o pomada y se excreta mayoritariamente en la orina al cabo de 72 horas.

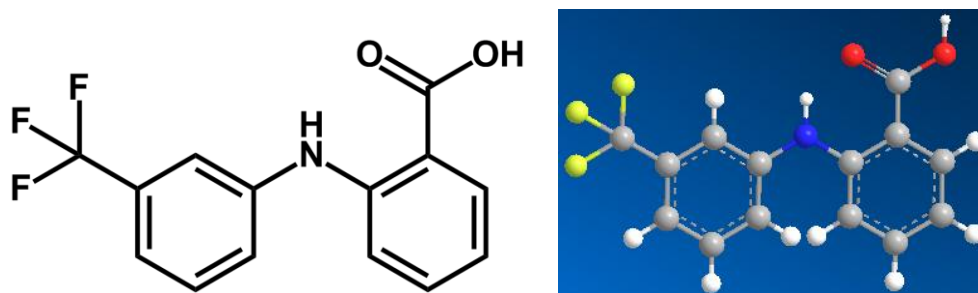


Figura 3. Estructura química en dos y tres dimensiones del ácido flufenámico.

- **Ácido tolfenámico (AT):** ejerce efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Al igual que los anteriores, su actividad antiinflamatoria se debe, fundamentalmente, a la inhibición de la ciclooxygenasa, y la consecuente reducción de la síntesis de prostaglandinas, mediadores básicos de la

inflamación. También ha demostrado inhibir edemas y eritemas, así como reducir hipertermias. Puede administrarse por vía oral o intravenosa, su vida media puede llegar hasta las 15 horas y su excreción tiene lugar mayoritariamente en orina.

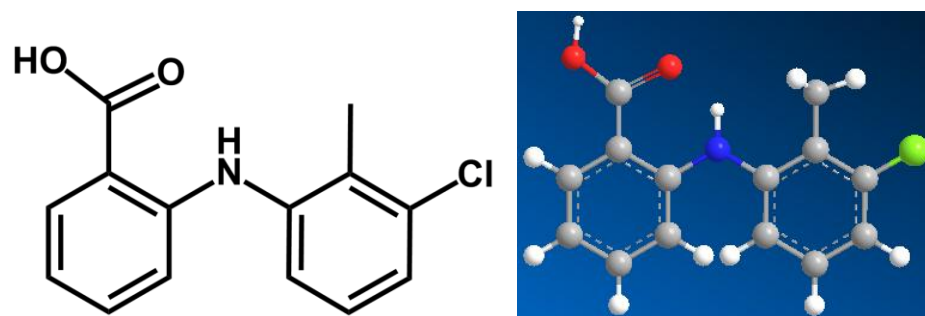


Figura 4. Estructura química en dos y tres dimensiones del ácido tolfenámico.

2. Características espectrales de los analitos

La fluorescencia nativa de los fenamatos es más intensa que la de las tetraciclinas, debido a la mayor conjugación en la estructura química de los primeros. Sin embargo, salvo a pH extremadamente ácido, aún no es suficientemente intensa como para el desarrollo de métodos de análisis fluorimétrico con bajos límites de detección [39, 278]. Esta dificultad queda subsanada en los trabajos aquí presentados gracias a la luminiscencia sensibilizada por lantánidos, puesto que está documentado que los fenamatos forman fácilmente complejos con terbio [39, 40]. A fin de obtener una intensidad luminiscente aún mayor, se utiliza óxido de trioctilfosfina (TOPO) como agente sinérgico y Tritón X-100 como surfactante, tal y como recomiendan Arnaud y Georges [40]. Las figuras 5, 6 y 7 muestran los espectros de luminiscencia total de los tres analitos complejados con terbio (100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de analito; pH 5,4; 5% v/v EtOH; 10^{-3} mol L^{-1} de terbio; 10^{-4} mol L^{-1} de TOPO; 0,04 % v/v de Tritón X-100).

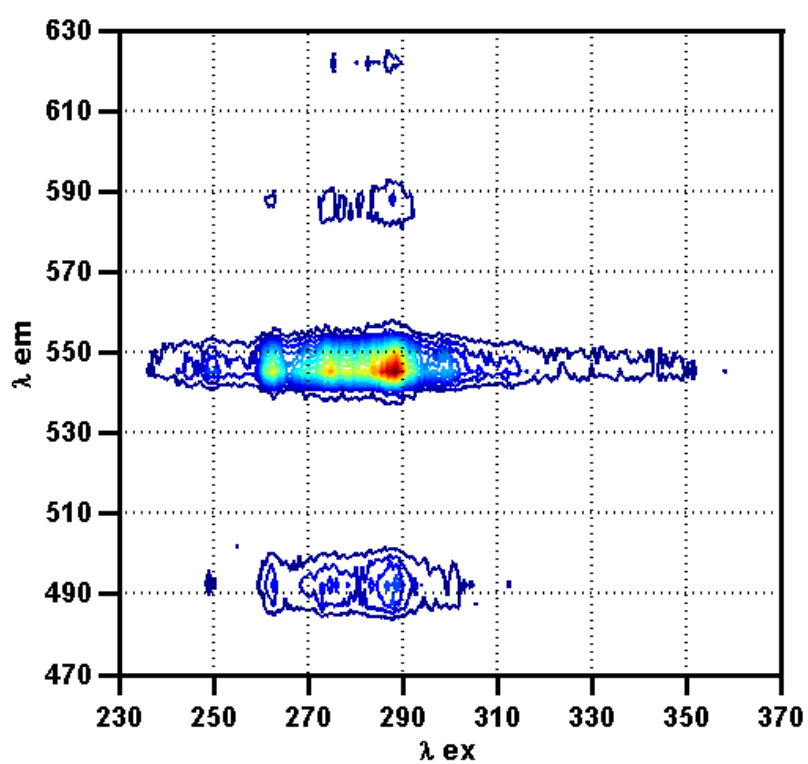
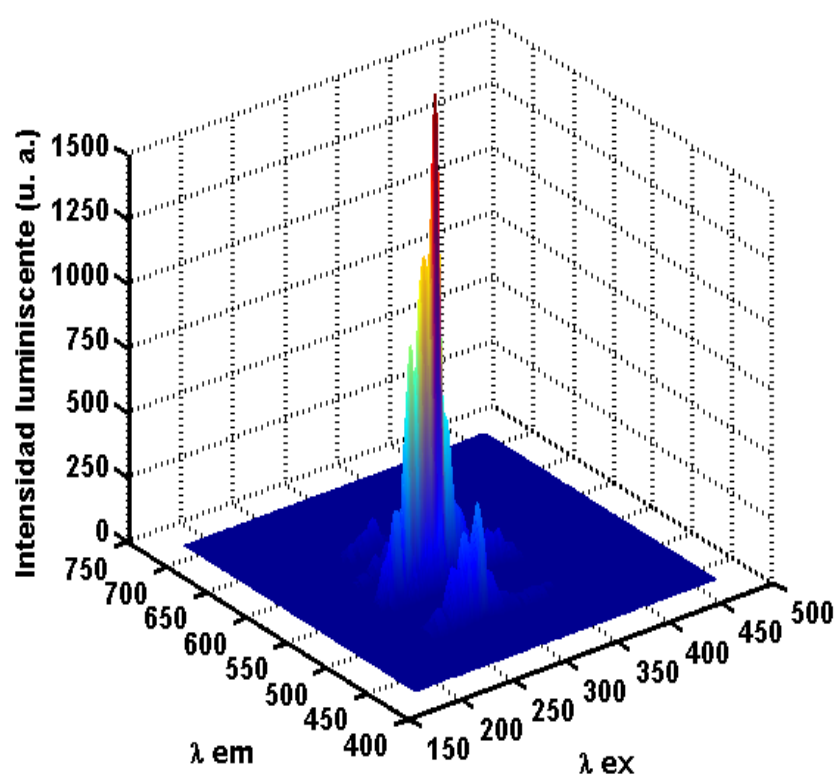


Figura 5. Espectro tridimensional de luminiscencia (arriba) y curvas de nivel (abajo) del complejo ácido flufenámico-terbio.

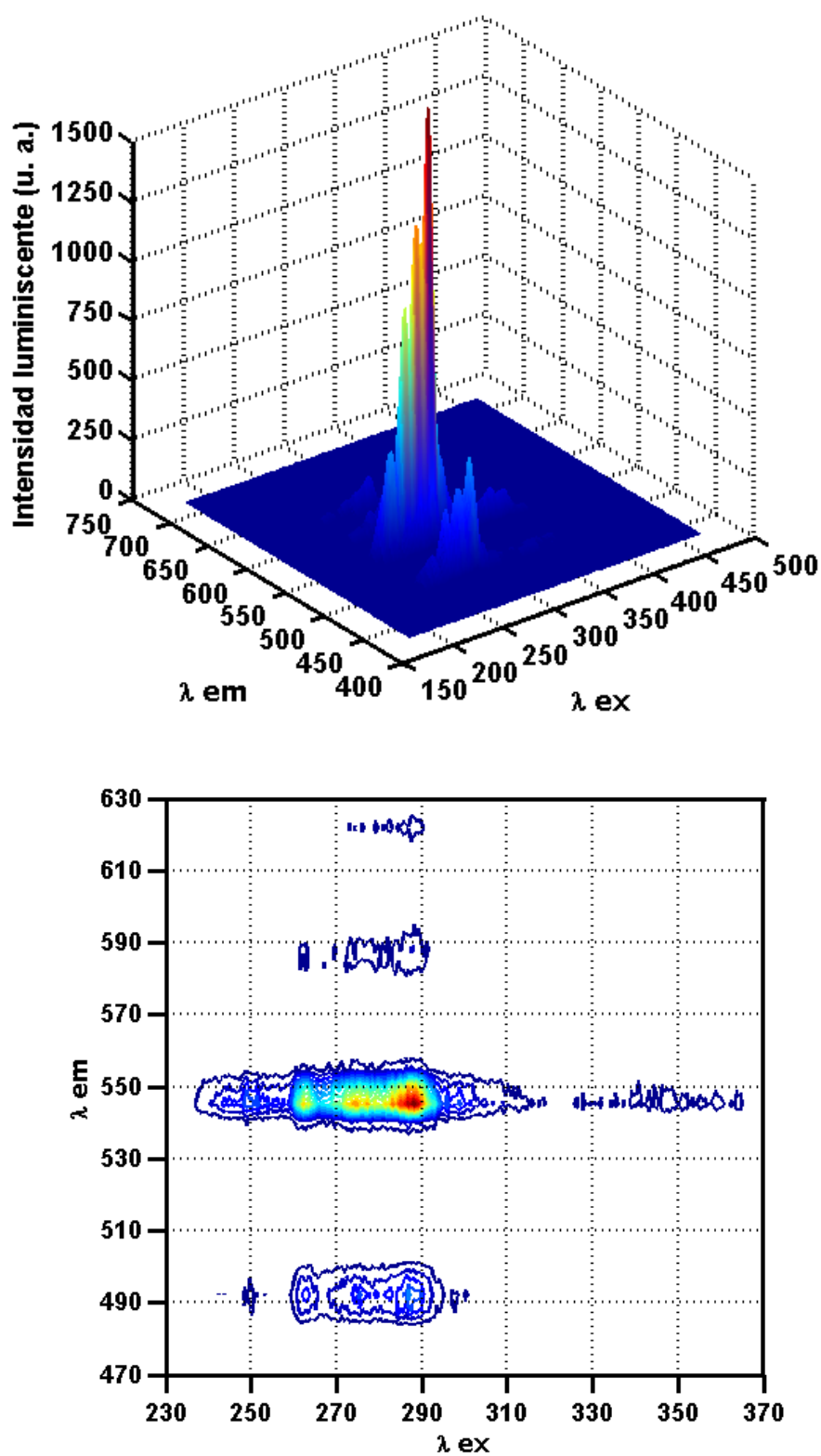


Figura 6. Espectro tridimensional de luminiscencia (arriba) y curvas de nivel (abajo) del complejo ácido mefenámico-terbio.

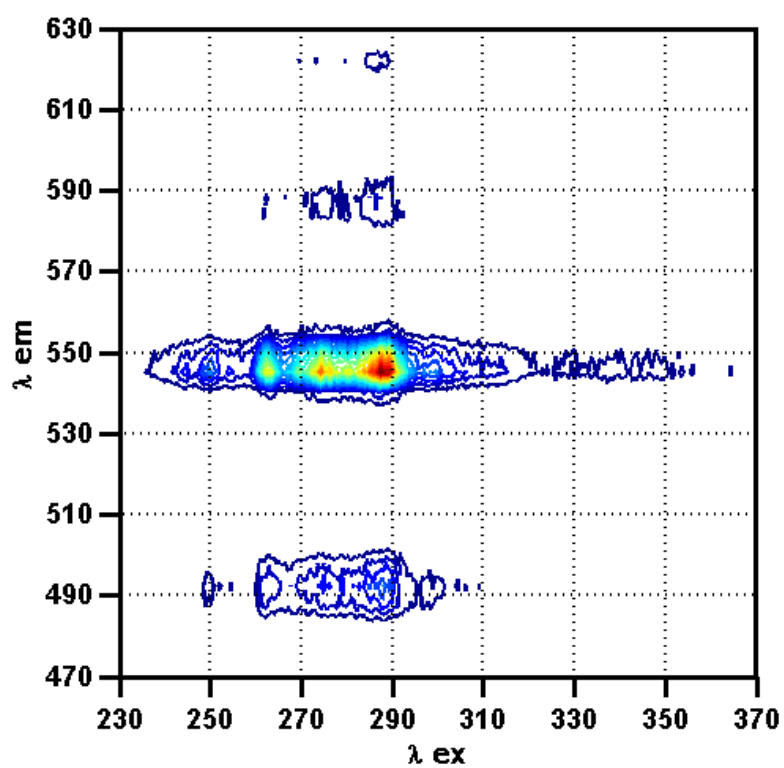
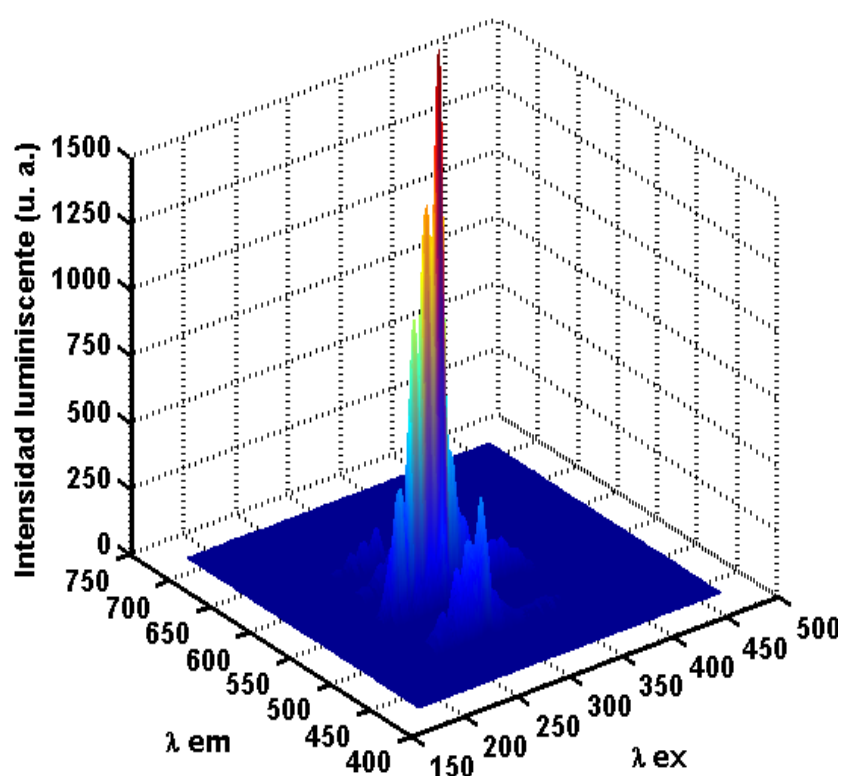


Figura 7. Espectro tridimensional de luminiscencia (arriba) y curvas de nivel (abajo) del complejo ácido tolfenámico-terbio.

La comparación de las figuras 5, 6 y 7 evidencia el completo solapamiento existente entre los espectros luminiscentes de los tres analitos. El máximo de excitación es 287 nm en todos los casos. Los máximos de emisión son los picos debidos al terbio, lo que demuestra que tiene lugar la transferencia de energía entre los analitos y el ion lantánido. El pico de emisión más intenso se halla a 546 nm.

En consecuencia, la luminiscencia sensibilizada por lantánidos permite la determinación de fenamatos gracias al aumento que tiene lugar en la intensidad luminiscente debido a la formación del complejo analito-terbio. Sin embargo, el completo solapamiento de los espectros de los complejos con el ion lantánido hace inviable la determinación de mezclas de fenamatos mediante técnicas luminiscentes convencionales basadas en la medida de la intensidad. En consecuencia, en los presentes trabajos se decidió abordar la determinación simultánea de los analitos mediante luminiscencia resuelta en el tiempo. Por ello, en primer lugar se estudiaron las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos fenamato-terbio.

3. Estudio de los tiempos de vida de luminiscencia

Las curvas de decaimiento luminiscente de los tres analitos (mismas condiciones químicas del apartado anterior; $\lambda_{\text{exc}}=287\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=546\text{ nm}$) se muestran en la figura 8. Dichas curvas se ajustaron utilizando el algoritmo de Marquardt [247], el cual está contenido en el software Felix32 del equipo. En la figura 9 pueden observarse los ajustes obtenidos, y en la tabla 1 aparecen recogidos los parámetros estadísticos de calidad obtenidos en el cálculo.

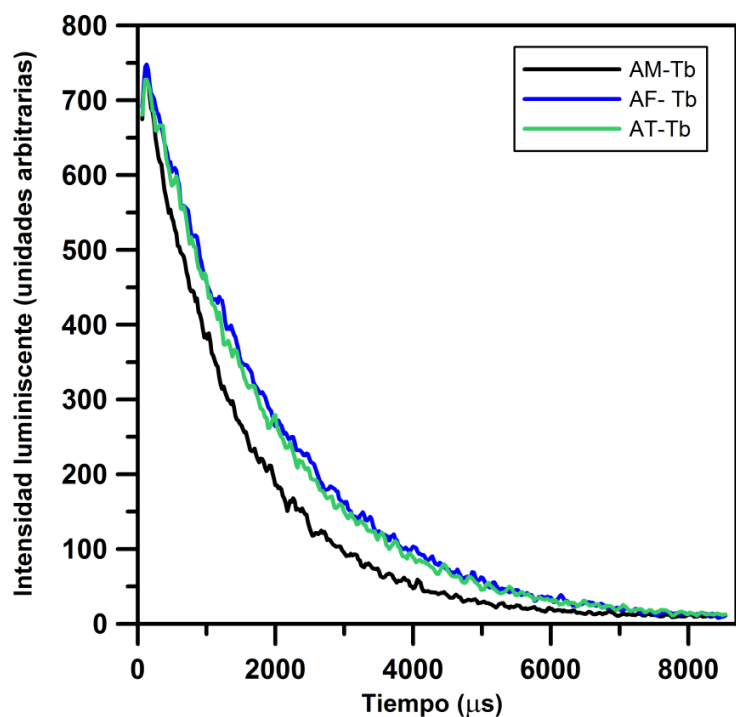


Figura. 8. Curvas de decaimiento luminiscente normalizadas de los complejos de los tres fenamatos (ácidos mefenámico, flufenámico y tolfenámico) con terbio.

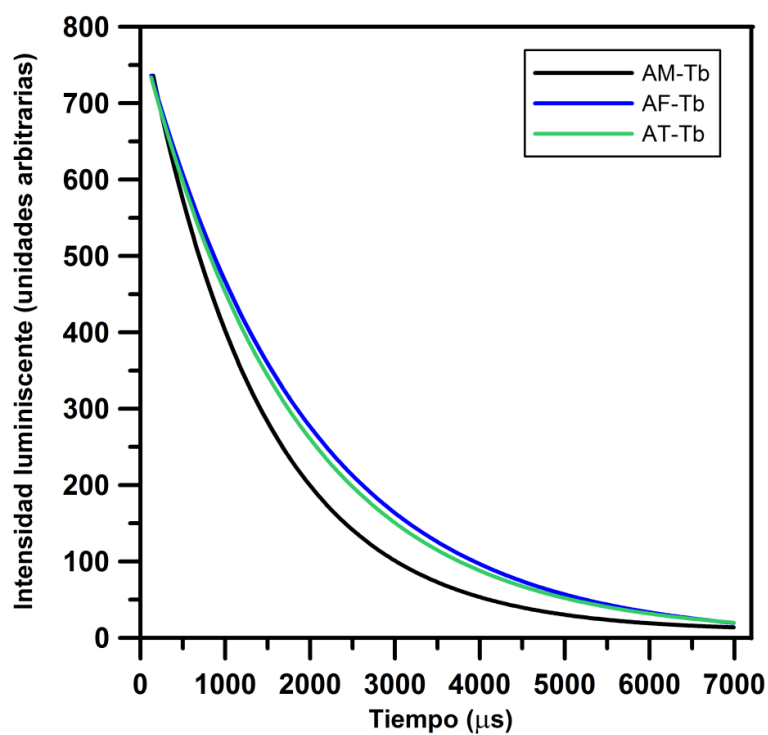


Figura 9. Ajustes obtenidos para las curvas de decaimiento de los complejos de los tres fenamatos (ácidos mefenámico, flufenámico y tolfenámico) con terbio.

Tabla 1. Tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad para los complejos de los tres fenamatos (ácidos mefenámico, flufenámico y tolfenámico) con terbio.

Parámetro	AM-Tb	AF-Tb	AT-Tb
χ^2	0,91	1,02	1,02
DW	2,28	2,01	2,03
Preexponencial	724 \pm 33	788,2 \pm 2,6	784,5 \pm 3,7
Tiempo de vida (μs)	1381,1 \pm 7,2	1913 \pm 11	1787 \pm 11

Los parámetros estadísticos de calidad muestran que en los tres casos los ajustes son satisfactorios, ya que el parámetro χ^2 se encuentra entre 0,8 y 1,3 y los valores del parámetro de Durbin-Watson (DW) son superiores a 1,7. La distribución tanto de la función de autocorrelación como de los residuales fue siempre aleatoria alrededor de cero. Los tiempos de vida medios calculados son 1381 μ s para el complejo AM-Tb, 1913 μ s para el complejo AF-Tb y 1787 μ s para el complejo AT-Tb.

Experimentalmente se comprobó que resulta inviable la resolución tanto de la mezcla ternaria de los fenamatos como de la mezcla binaria entre los ácidos tolfenámico y flufenámico por luminiscencia resuelta en el tiempo y posterior estudio mediante métodos multivariantes de las curvas de decaimiento. Este hecho se debe a que, como muestran las figuras 8 y 9, las curvas de decaimiento de los complejos AF-Tb y AT-Tb son demasiado semejantes entre sí como para que el modelo matemático sea capaz de distinguir entre ellas con fiabilidad y precisión.

Sin embargo, la curva de decaimiento AM-Tb sí es suficientemente diferente a las otras dos como para que el desarrollo del método indicado resulte eficaz en los casos de tener mezclas binarias entre AM-Tb y AT-Tb y entre AM-Tb y AF-Tb, tal y como se demostrará a continuación.

A. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO MEFENÁMICO Y ÁCIDO FLUFENÁMICO

A. 1. Antecedentes bibliográficos

Debido a su importancia farmacológica, existen numerosos métodos descritos en bibliografía para la determinación de ácido flufenámico y de ácido mefenámico. Se comentan a continuación únicamente aquellos trabajos que cuantifican ambos compuestos, bien de forma independiente, bien simultáneamente, haciendo hincapié en las determinaciones fluorimétricas:

- Los primeros métodos de análisis comenzaron a desarrollarse ya en la década de los 80 del siglo XX, y se basaban en la medida de la absorbancia. En bibliografía pueden encontrarse tanto **métodos colorimétricos** [279-282] como **métodos espectrofotométricos** [283-286].
- En 1987, Issa y col. [287] describieron un **método volumétrico**. Consistía en una reacción de precipitación de los fenamatos (con plata o mercurio) y la posterior valoración de los iones metálicos que no habían reaccionado.
- También se han descrito dos métodos basados en **electroforesis capilar**. El primero de ellos [288] se basó en complejación con β -ciclodextrina y detección UV, y se aplicó a fármacos, suero y orina, con límites de detección de alrededor de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$. El segundo hizo uso de isotacoforesis capilar y detección conductimétrica [289].
- En una **técnica voltamperométrica**, en este caso para determinar el punto final de una valoración, se basa también el método descrito por Aly y col. [290].

- En 1999 [291] se determinaron ambos fenamatos de forma indirecta mediante complejación con cobre y la medida de éste por **absorción atómica**.
- Sin embargo, la gran mayoría de métodos descritos se basan en técnicas cromatográficas. Así, la **cromatografía de líquidos** se ha utilizado ampliamente en la determinación de ácido flufenámico y ácido mefenámico en plasma [292-295], suero sanguíneo [296, 297], orina humana [297-300], orina equina [301-303], muestras forenses [304], preparaciones farmacéuticas [297, 298], agua de río [305] y leche [306]; y la **cromatografía de gases**, en plasma humano [307], plasma equino [302, 308, 309], orina humana [310-314], orina equina [308] y muestras de agua [315]. También se ha hecho uso de la cromatografía de fluidos supercríticos [316].
- Asimismo, existe en bibliografía un método [317] basado en la **reacción quimioluminiscente** de los fenamatos con Ce (IV) en presencia de Ru(bipy)³⁺ como sensibilizador. Los límites de detección fueron 3,6 nmol L⁻¹ para el ácido flufenámico y 0,21 µmol L⁻¹ para el ácido mefenámico.
- En cuanto a los **métodos fluorimétricos**, el primero de ellos fue propuesto por Huang y col. en 1989 [318], y se basa en la derivatización con pironina. Se obtuvieron límites de detección comprendidos entre 10 y 50 ng mL⁻¹.

En 1995, Alberio y col. [319] determinaron ácido flufenámico y ácido mefenámico en fármacos utilizando etanol como disolvente, inyección en flujo y detección fluorescente. Se formaron previamente complejos con Al(III) para intensificar la fluorescencia. Las recuperaciones se encontraron entre el 98 y el 101%, y los límites de cuantificación fueron 0,008 y 0,18 µg mL⁻¹ para los ácidos flufenámico y mefenámico, respectivamente.

En 1998 Sabry y col. [320] pudieron determinar ácidos flufenámico y mefenámico por métodos fluorimétricos en agua y sin necesidad de derivatizaciones, gracias a la intensificación de la fluorescencia de los analitos debida a la presencia del surfactante Tritón X-100. Los límites de detección

fueron del orden de los ng mL^{-1} . Pedraza y col. [321] utilizaron también surfactantes para aumentar la fluorescencia de varios fenamatos (entre ellos, ácidos flufenámico y mefenámico) en preparaciones farmacéuticas.

Sin embargo, de entre los trabajos que hacen uso de surfactantes, destaca el publicado por Arnaud y Georges en 2003 [40]. Estos autores investigaron la formación de complejos ternarios entre fenamatos, Tb y el óxido de trioctilfosfina (TOPO) en disoluciones acuosas de Tritón X-100. Concluyeron que la transferencia de energía entre los fenamatos y el ion terbio tiene lugar, originando una intensa luminiscencia, especialmente si el surfactante (Tritón X-100) y el sensibilizador (TOPO) se encuentran presentes. Se obtuvieron límites de detección de $2 \cdot 10^{-9}$ y $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para el ácido mefenámico y el ácido flufenámico, respectivamente. Sin embargo, no se abordaron determinaciones simultáneas.

Pérez Ruiz y col. [322] utilizaron la fluorescencia que ambos fenamatos muestran en cloroformo para determinarlos simultáneamente en fármacos y suero mediante fluorescencia sincrónica y derivadas de segundo orden. Los límites de detección fueron de 6 y 9 ng mL^{-1} para los ácidos flufenámico y mefenámico, respectivamente.

La fluorescencia de los fenamatos en cloroformo fue también aprovechada por Capitán Valvey y col. [323] para determinar simultáneamente ácidos flufenámico, meclofenámico y mefenámico, sin separación previa, en preparaciones farmacéuticas. El método hace uso de calibración multivariante para analizar las intensidades de fluorescencia a determinadas longitudes de onda.

Por último, un trabajo muy interesante es el de Muñoz de la Peña y col. [324]. Estos autores utilizaron matrices de fluorescencia total para el desarrollo de métodos de calibración multivariante de orden dos basados en diferentes algoritmos para determinar sin separación previa los ácidos mefenámico, meclofenámico y flufenámico en orina. Realizaron una extracción previa

utilizando cloroformo como disolvente, y los analitos pudieron determinarse con éxito en el rango de 80 a 250 mg L⁻¹.

Como puede verse, aún no existe en bibliografía ningún método de análisis que haga uso de las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos entre los ácidos mefenámico y flufenámico y el Tb³⁺, y menos aún un método basado en luminiscencia resuelta en el tiempo que permita determinar los dos fenamatos simultáneamente.

A. 2. Estabilidad de las disoluciones

Se prepararon disoluciones madre de ácido mefenámico y de ácido flufenámico 50,0 mg L⁻¹ disolviendo sus hidroclouros en NaOH 0,1 mol L⁻¹. Las disoluciones se conservaron a 4°C y en la oscuridad. Mediante la medida de la intensidad de luminiscencia del pico a 548 nm de sus complejos con terbio (λ_{exc} = 289 nm) se determinó que ambos analitos en disolución eran estables durante al menos tres semanas. A partir de estas disoluciones se prepararon las disoluciones de trabajo, las cuales resultaron estables durante un mínimo de una hora.

A. 3. Optimización secuencial de variables

A continuación, se procedió a la optimización secuencial de todas las variables que influyen en el registro de las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos entre los analitos en estudio y el terbio.

A.3.1. Optimización de variables químicas

Como variables químicas de partida, se utilizaron los valores indicados por Arnaud y Georges [40] para la determinación luminiscente de derivados de ácidos antranílicos en disoluciones acuosas (ver tabla A.1.)

Tabla A.1. Parámetros químicos iniciales.

[Tb³⁺]	$1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
[TOPO]	$5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
% Tritón X-100	0,05 % v/v

En todos los casos, la concentración tanto de ácido flufenámico como de ácido mefenámico fue $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$, y las longitudes de onda de medida de excitación y de emisión fueron 286 y 546 nm, respectivamente.

A.3.1.1. pH de la disolución

La influencia del pH en la luminiscencia de los complejos entre los fenamatos y el terbio se estudió en el intervalo comprendido entre 2,0 y 11,0 mediante adiciones de cantidades adecuadas de HCl o NaOH hasta obtener el pH deseado en cada caso. En la figura A.1 se representa la intensidad máxima de la curva de decaimiento luminiscente para cada caso estudiado. Como era de esperar, las señales de mayor intensidad se obtienen a pH superiores a 5 porque ambos fenamatos se encuentran completamente ionizados. Este hecho favorece la formación de sus complejos con el terbio y, por tanto, maximiza la transferencia de energía. Los datos se muestran también en la tabla A.2, incluyéndose los tiempos de vida calculados en cada caso haciendo uso del algoritmo contenido en el Felix32.

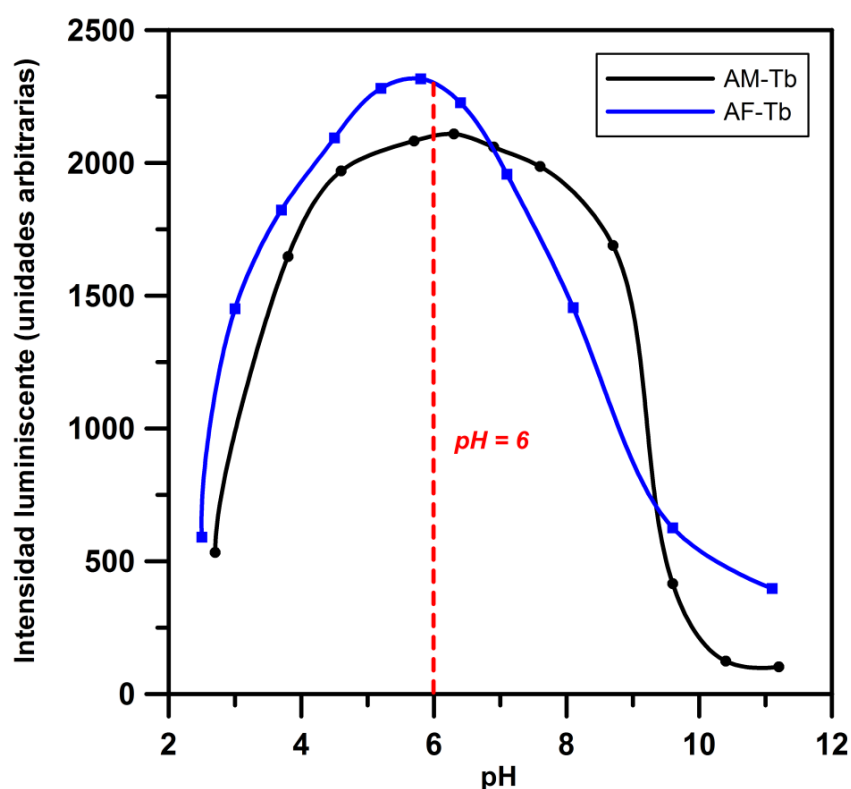


Figura A.1. Influencia del pH en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

Tabla A.2. Influencia del pH en la intensidad máxima de luminiscencia y en los tiempos de vida de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

AM-Tb			AF-Tb		
pH	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)	pH	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)
2,7	607	1280	2,5	770	1947
3,8	1893	1219	3,0	1721	1967
4,6	2264	1332	3,7	2408	2026
5,7	2423	1343	4,5	2608	1982
6,3	2460	1350	5,2	2785	2015
6,9	2417	1349	5,8	2837	2026
7,6	2251	1291	6,4	2714	1981
8,7	1942	1282	7,1	2437	1922
9,6	535	1175	8,1	1794	1870
10,4	133	976	9,6	717	1504
11,2	112	870	11,1	420	1186

El pH no afecta a la localización del máximo de luminiscencia, pero sí a su intensidad, así como al tiempo de vida. Como puede verse, al aumentar el pH se produce un aumento en la intensidad de luminiscencia hasta llegar a un máximo en torno a pH 6, por encima del cual la señal cae drásticamente debido a la precipitación de hidróxido de terbio.

El valor calculado para los tiempos de vida presenta una influencia similar. La diferencia entre el tiempo de vida para los dos complejos está siempre en torno a los 600 μ s. A pH básico los valores de los tiempos de vida se encuentran más próximos entre sí, si bien su cálculo no es fiable.

Se decidió elegir un valor de pH 6,0 porque a él la separación entre las curvas de decaimiento para ambos complejos es suficiente para su determinación simultánea y porque a este pH se obtiene la máxima intensidad. El siguiente paso fue escoger un tampón que permitiera mantener este pH óptimo en experiencias sucesivas.

A.3.1.2. Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima

Se ensayó en primer lugar el tampón ácido cítrico/citrato, y a continuación el tampón dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato. Tanto uno como otro provocaron la desaparición completa de la señal luminiscente por precipitación de citrato y fosfato de terbio. Se probó a continuación el tampón ácido carbónico/bicarbonato, con el cual sí se obtuvo una señal intensa. Sin embargo, la capacidad reguladora del pH resultó ser muy limitada.

Finalmente se ensayó el tampón ácido acético/acetato ($pK_a = 4,76$) a pH 5,4, y se decidió escogerlo porque tamponaba adecuadamente sin dar lugar a precipitaciones y consecuentes descensos en la intensidad luminiscente. Como puede verse, el uso de este tampón implica bajar ligeramente el pH óptimo, a fin de que éste se encuentre dentro del rango de capacidad reguladora máxima del tampón acetato (3,76 - 5,76). Esto no supuso ningún problema porque pH 5,4 se encuentra aún en la zona de máximas

intensidades tanto para el ácido flufenámico como para el ácido mefenámico (véase la figura A.1).

Para seleccionar la concentración óptima del tampón, se estudió el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,01 y 0,50 mol L⁻¹. En la figura A.2 se representan los resultados obtenidos.

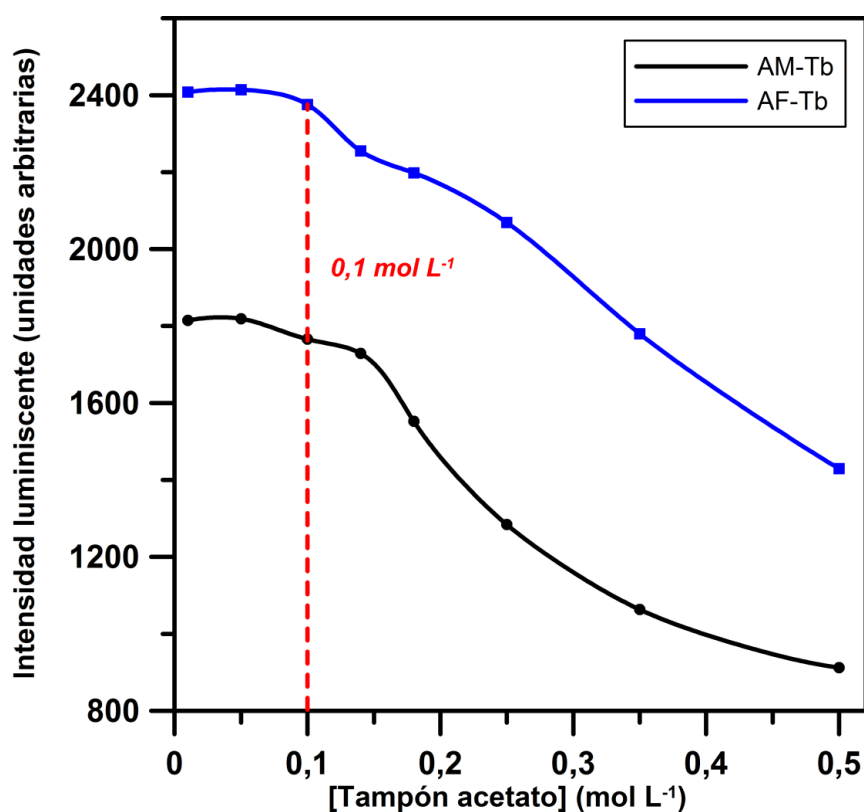


Figura A.2. Influencia de la concentración de tampón acetato en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

Como muestra la figura A.2, al aumentar la concentración de tampón acetato, disminuye la intensidad luminiscente, siendo el descenso especialmente acusado a partir de 0,15 mol L⁻¹. Por ello, lo más conveniente es elegir una concentración de tampón lo más baja posible. No obstante, no se escogió el valor más bajo ensayado (0,01 mol L⁻¹), sino 0,10 mol L⁻¹, con el fin de garantizar una capacidad reguladora adecuada en la posterior determinación de los analitos en muestras de orina. La variación de la

concentración de tampón ácido acético/acetato no tuvo efecto alguno sobre la localización de los máximos de luminiscencia ni sobre los valores de los tiempos de vida.

A.3.1.3. Optimización de la concentración de terbio

Se varió la concentración de terbio en las disoluciones de medida entre $1 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ con la finalidad de determinar cómo afectaban estos cambios a la intensidad de luminiscencia de los complejos analito-terbio. El resultado de este estudio puede verse en la figura A.3.

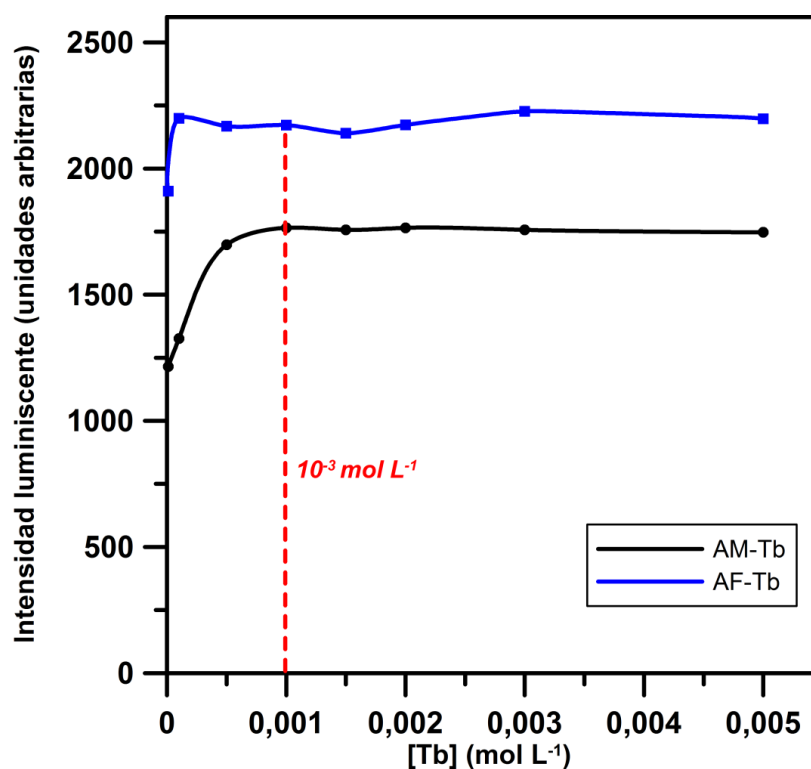


Figura A.3. Influencia de la concentración de Tb^{3+} en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

Una concentración mínima de terbio es necesaria para alcanzar el valor máximo de intensidad luminiscente. Por encima de este valor, dicha intensidad se mantiene

constante en el intervalo estudiado. Se produce una ligera oscilación en los tiempos de vida calculados, pero la diferencia entre los valores máximo y mínimo es siempre inferior al 5% para ambos complejos. Como concentración de iones terbio óptima se eligió $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A.3.1.4. Optimización de la concentración de TOPO y del porcentaje de etanol

Como se halla recogido en la figura A.4, en este estudio se varió la concentración de TOPO entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

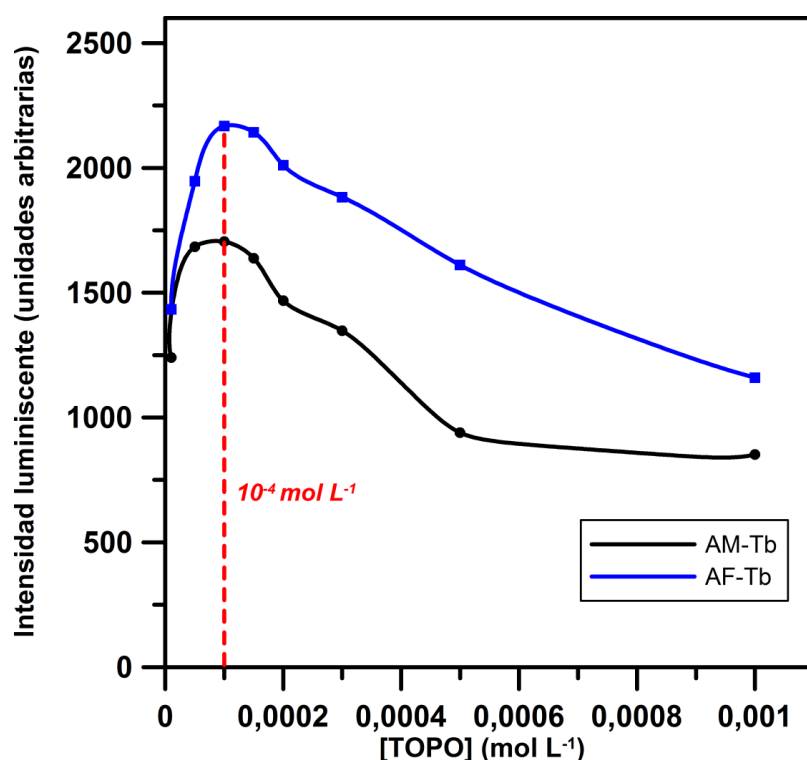


Figura A.4. Influencia de la concentración de TOPO en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

Es bien sabido que la presencia de ligandos sinérgicos, como el TOPO, provoca un brusco aumento de la intensidad en las técnicas de luminiscencia sensibilizada por lantánidos: además de eliminar las moléculas de agua de la esfera de coordinación de los iones Tb^{3+} , los ligandos sinérgicos desfavorecen la desactivación

no radiante de los complejos analito-lantánido formados. Este efecto se encontró experimentalmente, especialmente en el caso del complejo ácido flufenámico. La máxima intensidad se alcanza con una concentración de TOPO 10^{-4} mol L⁻¹, valor que se escogió como óptimo, puesto que a valores superiores la intensidad luminiscente disminuye enormemente. Excepto a valores extremos, los tiempos de vida se mantienen constantes en todos los casos.

Puesto que en la preparación de la disolución madre de TOPO se utilizó un 10% v/v de etanol a fin de que el compuesto se disolviera, se creyó conveniente también determinar la influencia en las curvas de decaimiento de la presencia de etanol. Una concentración de TOPO 10^{-4} mol L⁻¹ en las disoluciones de medida implica la presencia de un 1% de etanol. Por tanto, en el estudio este valor tuvo que tomarse como mínimo. En la tabla A.3 y la figura A.5 pueden verse los resultados obtenidos. La localización de los máximos de luminiscencia no cambia con el porcentaje de etanol, pero sí varían en gran medida la intensidad (que decae bruscamente por encima del 10 %) y el tiempo de vida (aunque la diferencia entre las curvas de decaimiento de ambos complejos son más o menos constantes). Se eligió como valor óptimo un 5% de etanol.

Tabla A.3. Influencia del porcentaje de etanol en la intensidad máxima de luminiscencia y en los tiempos de vida de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

	AM-Tb		AF-Tb	
EtOH (%)	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)
1	1802	1323	2506	2037
5	1886	1289	2567	2013
10	1698	1204	2455	1967
15	1287	1072	1388	1797
20	342	962	371	322

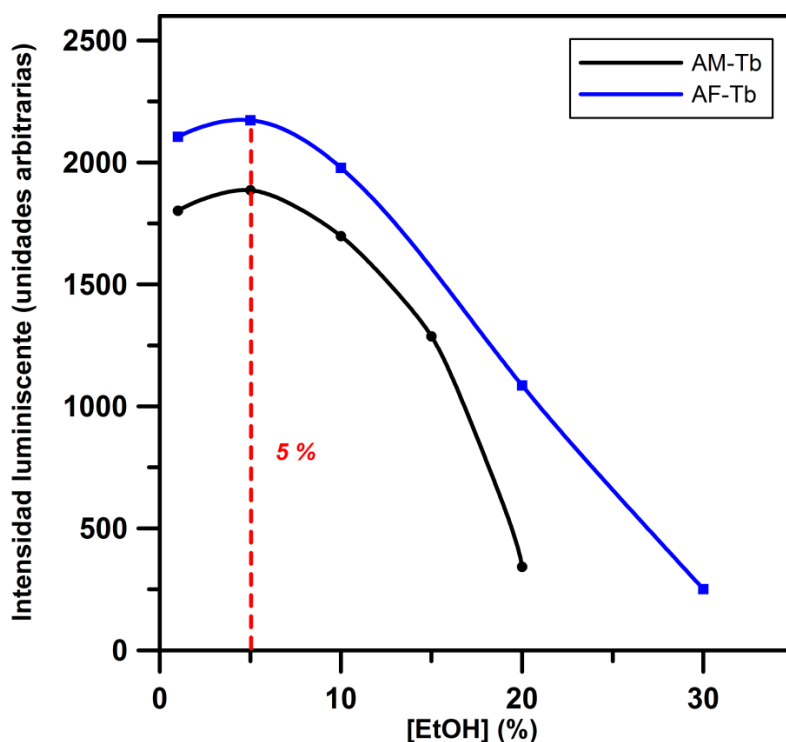


Figura A.5. Influencia del porcentaje de etanol en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

A.3.1.5. Optimización de la concentración de Tritón X-100

El estudio se efectuó en el intervalo comprendido entre 0,01 y 0,07 % v/v. Al igual que la presencia de TOPO, la respuesta es también muy sensible a la adición del surfactante Tritón X-100 al sistema (véase la figura A.6), ya que los surfactantes evitan la atenuación de la luminiscencia debida a la coordinación de moléculas de agua y protegen al quelato contra procesos de desactivación no radiante. El valor óptimo se encuentra a 0,04 % v/v, ya que cualquier otro valor, tanto mayor como más pequeño, implica una intensidad luminiscente menor para ambos complejos. A una concentración del 0,01 % v/v los tiempos de vida calculados son muy inferiores a los esperados, pero a concentraciones superiores no hay ya diferencia apreciable (en ningún caso llegan a ser un 5% mayores o menores con respecto a los tiempos de vida calculados en el apartado 3 del presente capítulo).

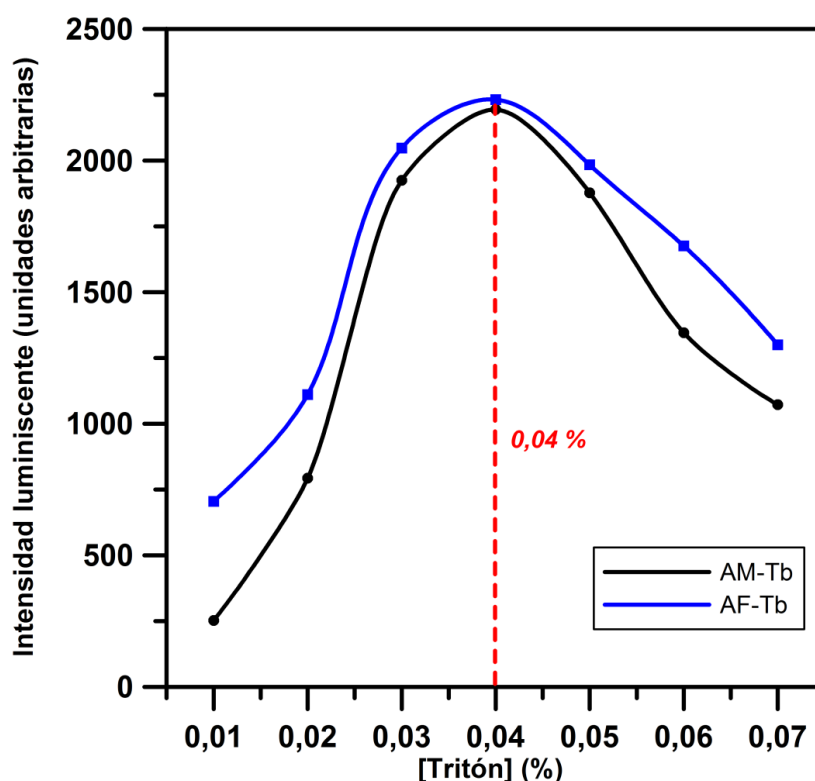


Figura A.6. Influencia la concentración de Tritón X-100 en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

A.3.1.6. Influencia de la temperatura

Como se indicó en el capítulo introductorio, el aumento de la temperatura produce la disminución de la intensidad de la señal luminiscente debido a que, en aquellos casos en los que la transferencia de energía es intramolecular, se favorecen los procesos de desactivación no radiante frente a los de desactivación radiante. Esta tendencia se obtuvo experimentalmente para los complejos AF-Tb y AM-Tb en el intervalo estudiado (de 5 a 40 °C), como muestra la figura A.7. Este hecho confirma que la transferencia de energía ocurre, efectivamente, de forma intramolecular. Sin embargo, no se consideró oportuno elegir el valor que proporciona una intensidad máxima (5 °C), sino 20 °C, a fin de poder trabajar a una temperatura cercana a la ambiente y, por tanto, de termostatización rápida y fácil.

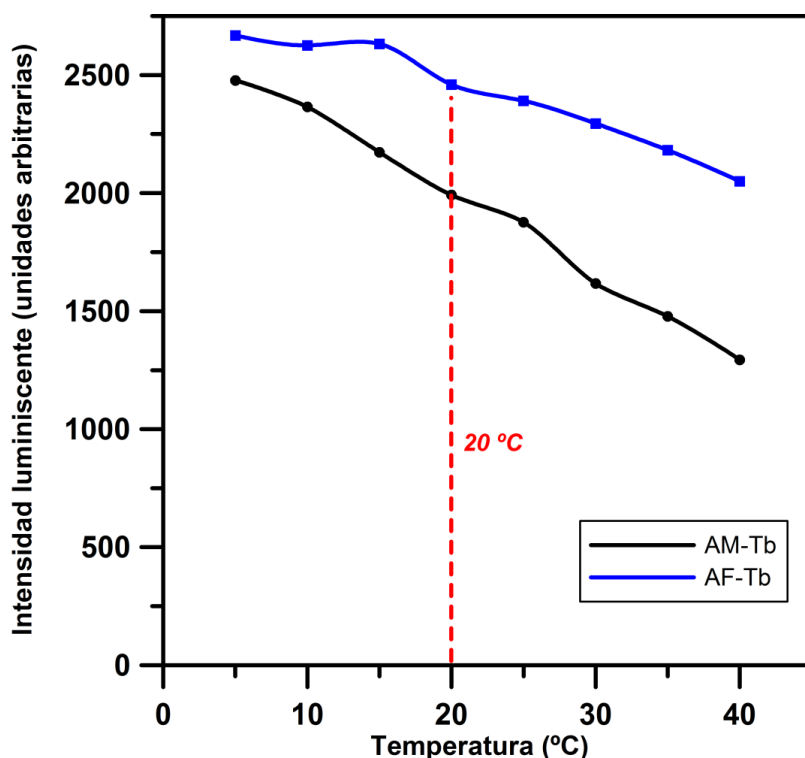


Figura A.7. Influencia de la temperatura en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AF-Tb.

A.3.2. Optimización de variables instrumentales

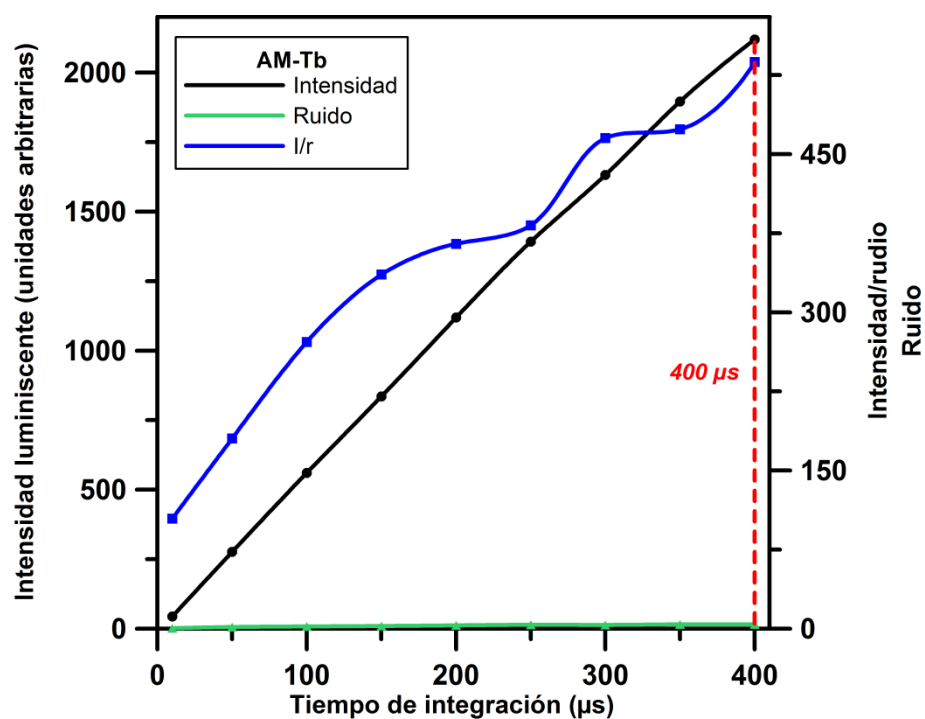
En la optimización de las variables instrumentales se tuvo en cuenta tres factores: el tiempo de registro de las curvas, la máxima intensidad luminiscente obtenida y la relación señal ruido. El ruido instrumental se calculó sustrayendo a la cola de la curva de decaimiento obtenida experimentalmente esa misma señal, pero tratada con un factor de 21 puntos de suavizado, y calculando la desviación estándar de dicha resta. Se utilizaron los valores optimizados anteriormente para las variables químicas. En todos los casos se registró la curva de decaimiento luminiscente a $\lambda_{\text{exc}} = 287 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$ entre 0 y 8500 μs . Los valores iniciales para las variables instrumentales fueron los recogidos en la tabla A.4.

Tabla A.4. Parámetros instrumentales iniciales.

Tiempo de integración	400 μ s
Número de disparos	11
Número de medias	3
Frecuencia	100 Hz
Número de canales	400

A.3.2.1. Optimización del tiempo de integración

La influencia del tiempo de integración en la señal luminiscente se estudió en un intervalo comprendido entre 10 y 400 μ s (puesto que el software no permite aumentar más el tiempo de integración con el intervalo de registro escogido), tal y como refleja la figura A.8.



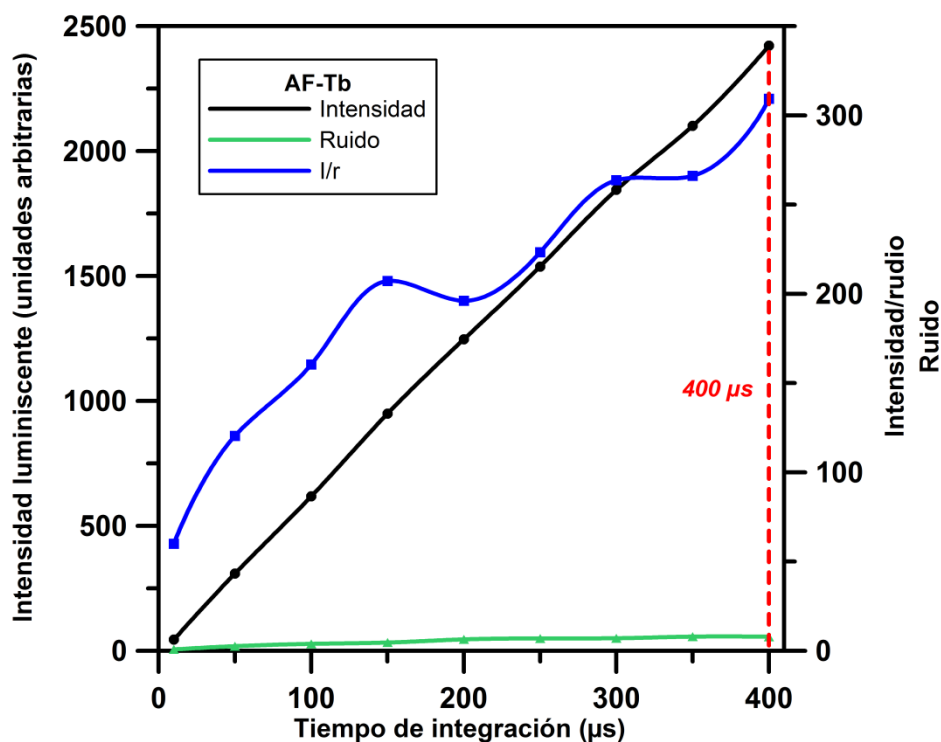


Figura A.8. Influencia del tiempo de integración en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AF-Tb (abajo).

El tiempo de registro no depende del tiempo de integración. Se decidió tomar como óptimo 400 μs porque a este valor se obtenían tanto la intensidad mayor de luminiscencia como la máxima relación señal/ruido.

A.3.2.2. Optimización del número de disparos

El número de disparos (o número de destellos de la lámpara pulsada para cada punto registrado en la curva de decaimiento) se estudió en el intervalo comprendido entre 1 y 35. Como se puede observar en la figura A.9, la intensidad luminiscente se mantiene constante entre estos valores; sin embargo, la relación señal/ruido aumenta con el número de disparos, hecho que se debe a la disminución del ruido instrumental.

No se escogió como óptimo el valor de señal/ruido más alto (35 disparos) porque implicaba tiempos de registro excesivamente elevados y, como se comentó en el capítulo anterior, estadísticamente resulta ser más conveniente alargar un análisis

registrando un mayor número de medias de cada curva registrada que aumentando el número de disparos.

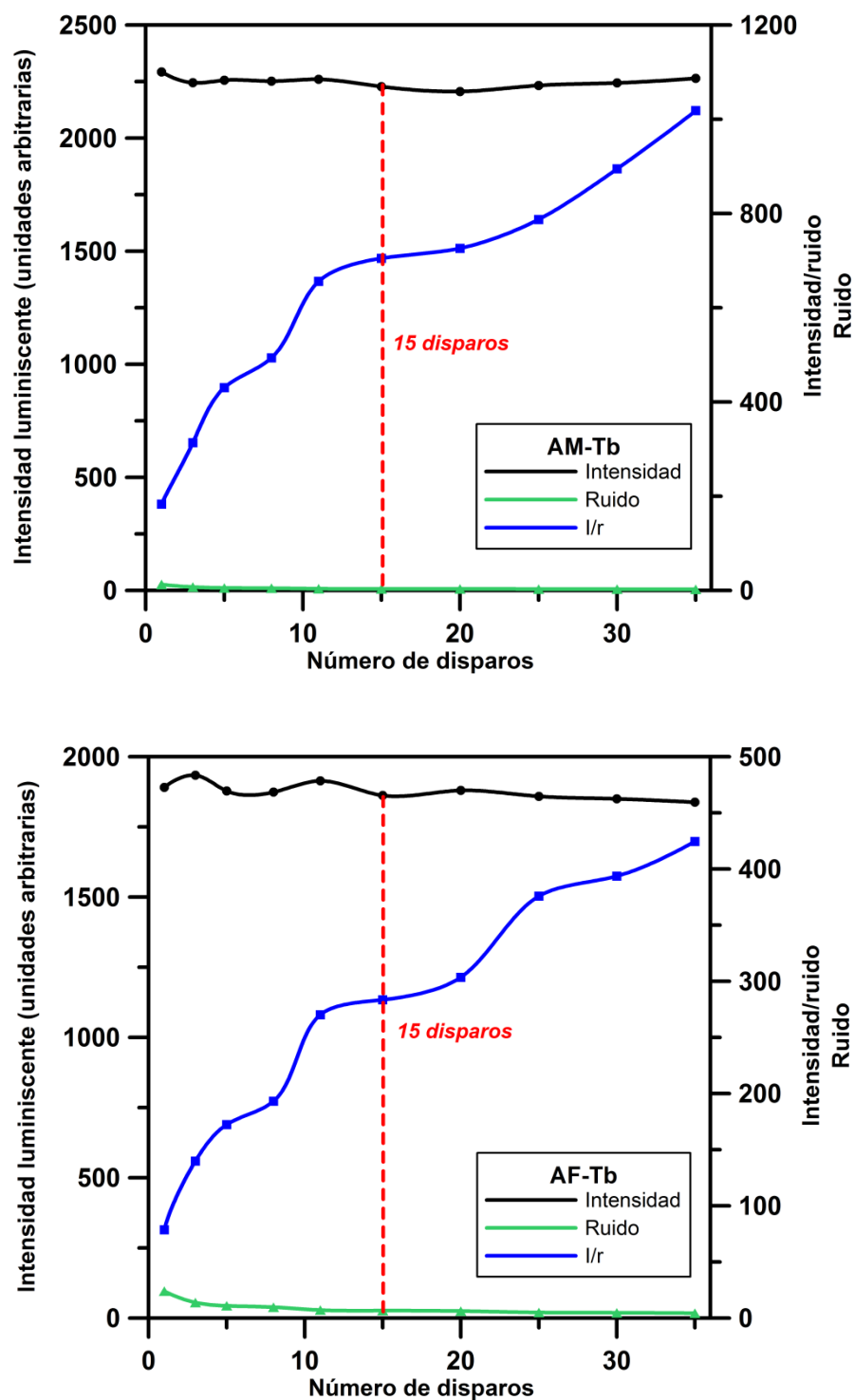
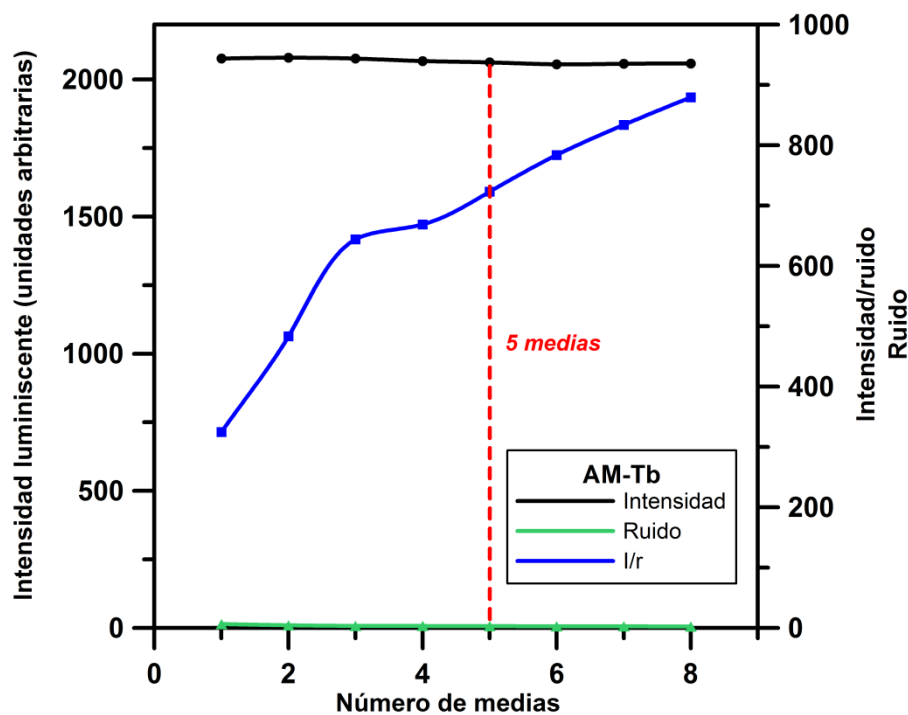


Figura A.9. Influencia del número de disparos de la lámpara en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AF-Tb (abajo).

A.3.2.3. Optimización del número de medias

Variar este parámetro implica variar el número de veces que el equipo registra cada curva de decaimiento luminiscente. Al final de cada análisis, en pantalla se muestra la media de cada curva, calculada a partir de todos los datos obtenidos. Aumentar el número de medias es muy ventajoso porque el ruido instrumental se reduce drásticamente, mientras que la intensidad máxima luminiscente se mantiene constante en todos los casos. Sin embargo, el tiempo de registro también aumenta, de tal forma que un número de medias muy alto es estadísticamente beneficioso pero inviable experimentalmente.

Se estudió este parámetro entre una y ocho medias (ver figura A.10), y se eligió cinco como valor óptimo, a pesar de que la relación señal/ruido seguía aumentando a números de medias mayores, a fin de no obtener tiempos de registro excesivamente largos.



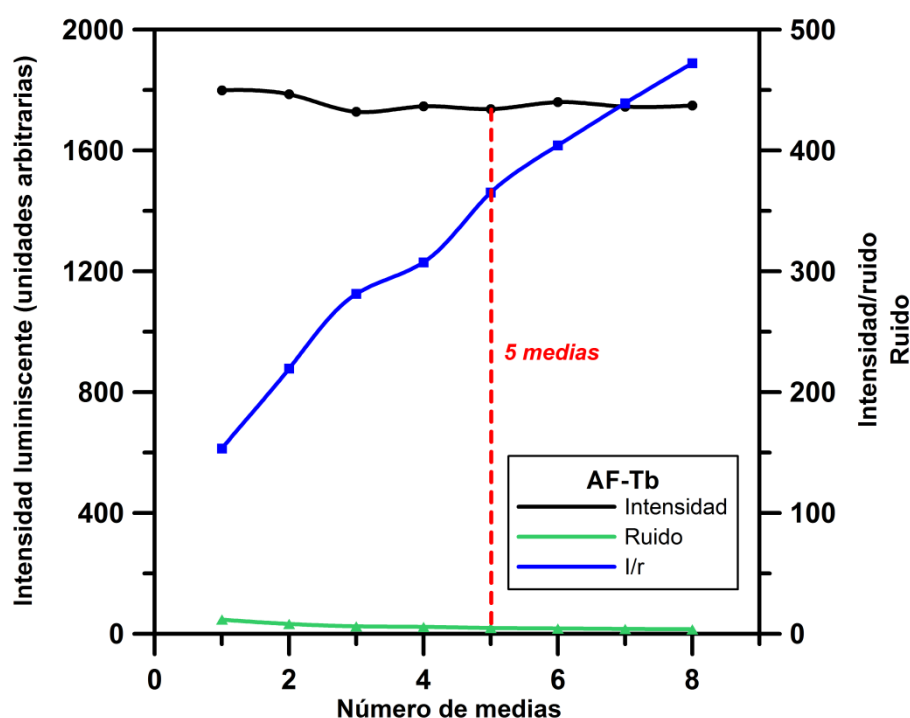


Figura A.10. Influencia del número de medias en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AF-Tb (abajo).

A.3.2.3. Optimización de la frecuencia de la lámpara

La frecuencia, o número de destellos de la lámpara por segundo, se estudió entre 20 y 100 Hz. Como se aprecia en la figura A.11, el cambio de la frecuencia apenas tiene influencia ni en los valores de máxima intensidad luminiscente ni en la relación señal/ruido. Sin embargo, según aumenta la frecuencia disminuye el tiempo de registro, por lo que se decidió escoger 100 Hz como valor de frecuencia óptimo para posteriores análisis.

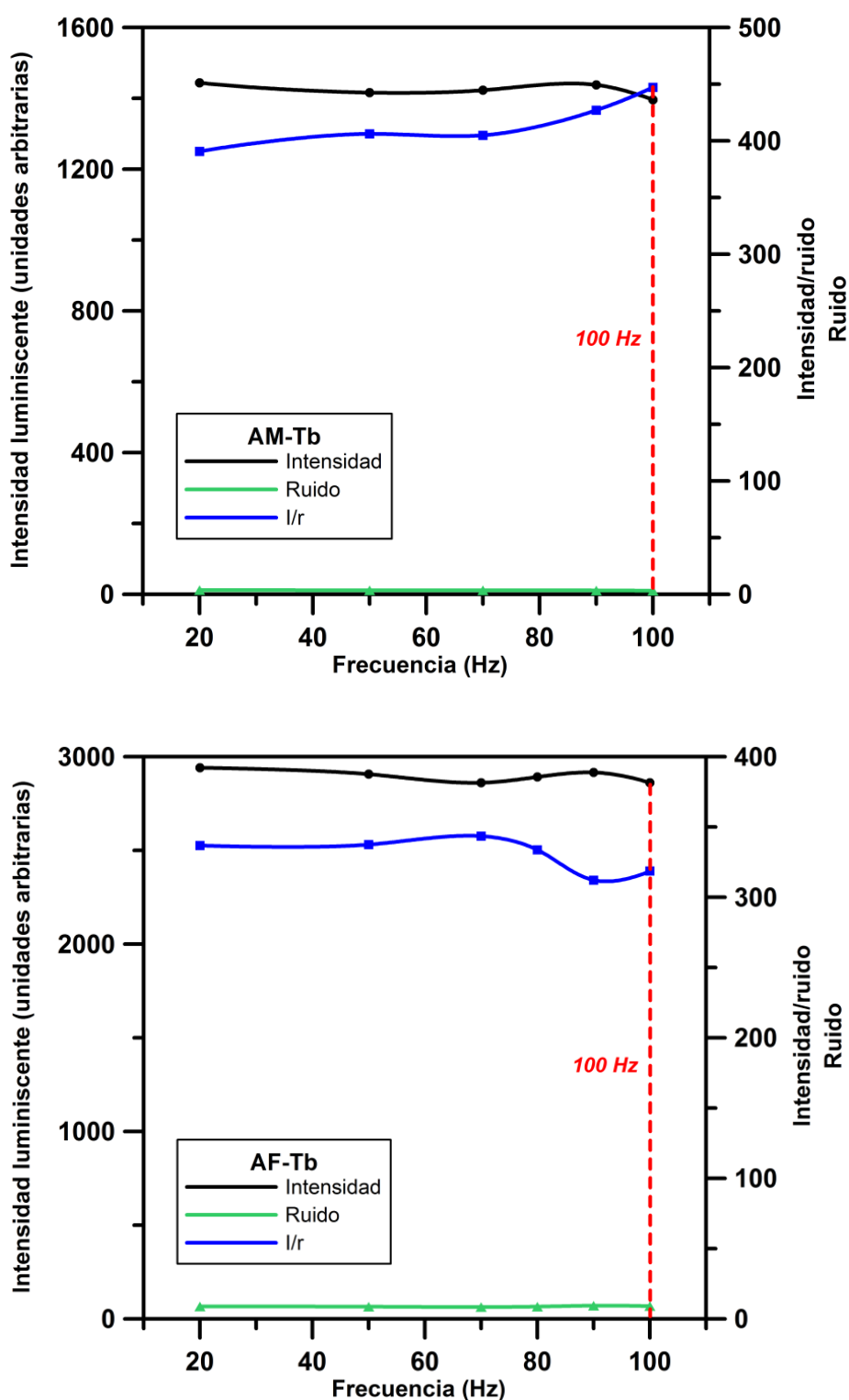


Figura A.11. Influencia de la frecuencia de destellos en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AF-Tb (abajo).

A.3.2.4. Optimización del número de canales

El número de canales o número de puntos que el equipo registra para cada curva de decaimiento luminiscente se varió para este estudio entre 50 y 800 (figura A.12).

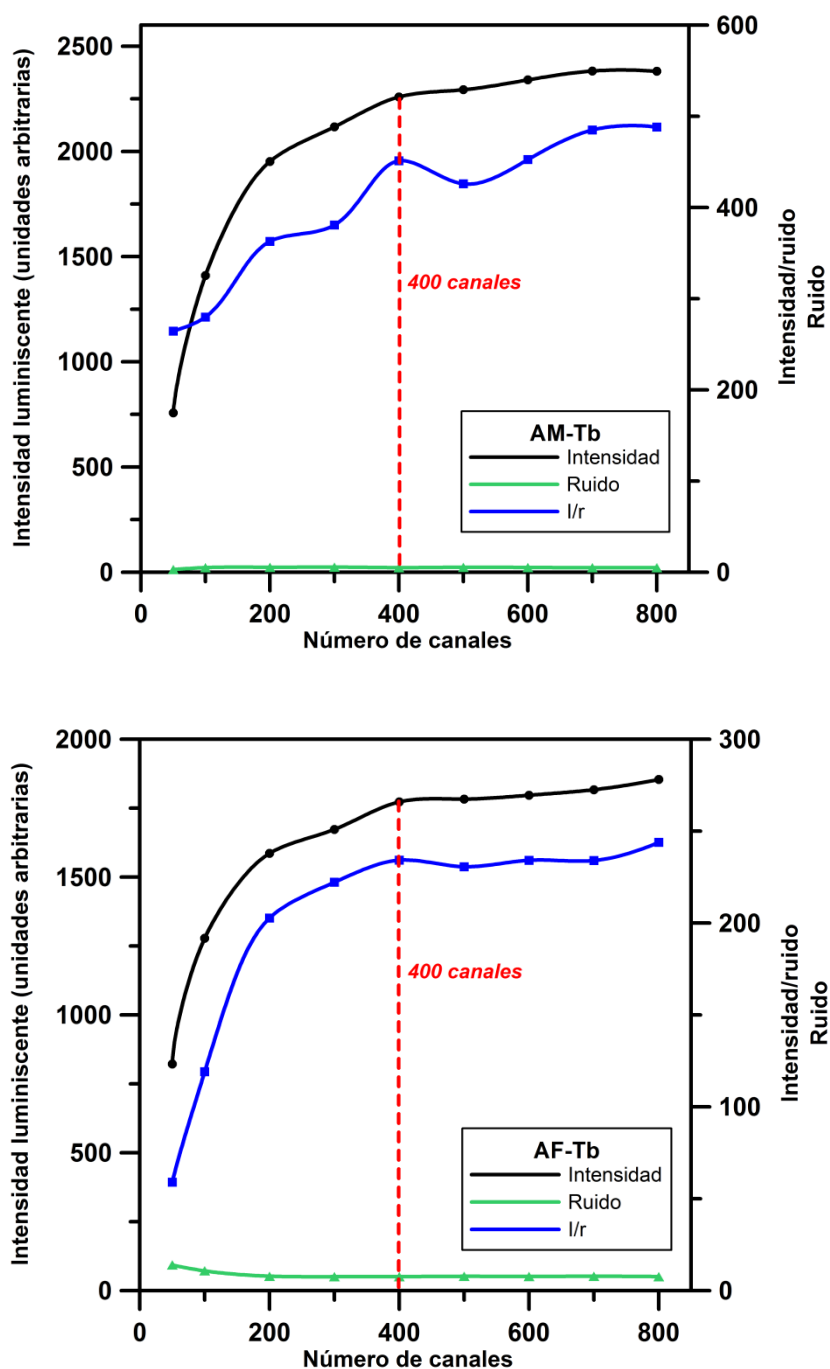


Figura A.12. Influencia del número de canales en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AF-Tb (abajo).

Obsérvese en la figura A.12 que la intensidad luminiscente aumenta con el número de canales. Este hecho se debe a que la resolución de la curva es cada vez mayor cuantos más puntos se registren (a un número de canales bajo no se registra el auténtico valor del máximo de luminiscencia). Con el número de canales también aumentan la relación señal/ruido y el tiempo de registro. Se decidió elegir como número de canales óptimo 400 porque a partir de este valor apenas aumenta ya la relación señal/ruido y, sin embargo, los tiempos de registro comienzan a ser excesivamente largos.

A.3.2.5. Selección del modo de adquisición

Si bien el equipo permite realizar la adquisición de las curvas de decaimiento bien de forma secuencial, bien de forma aleatoria, como los compuestos estudiados en este trabajo no sufren fotodescomposición se optó por registrar siempre las curvas de decaimiento en modo lineal, puesto que el uso del modo aleatorio implicaría únicamente una contribución adicional al ruido instrumental.

Las tablas A.5 y A.6 resumen los valores óptimos elegidos para todas las variables estudiadas, tanto químicas como instrumentales.

<p><i>Tabla A.5. Valores óptimos escogidos para las variables químicas.</i></p>	
pH	5,4
[Tampón acetato]	0,1 mol L ⁻¹
[Tb³⁺]	10 ⁻³ mol L ⁻¹
[TOPO]	10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
% EtOH	5 % v/v
% Tritón X-100	0,04 % v/v
Temperatura	20 °C

Tabla A.6. Valores óptimos escogidos para las variables instrumentales.

Tiempo de integración	400 μ s
Número de disparos	11
Número de medias	5
Frecuencia	100 Hz
Número de canales	400

A.4. Estudio de la linealidad

Una vez completado el proceso de optimización secuencial de las variables que influyen en las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos fenamato-terbio, se llevó a cabo un estudio para determinar en qué intervalo las respuestas instrumentales son lineales con respecto a las concentraciones de los analitos. Esto es fundamental, puesto que se trata de un requisito para poder aplicar el modelo de calibración multivariante PLS-1.

Se estudió el rango dinámico comprendido entre 1,0 y 5000,0 μ g L⁻¹, dentro del cual se registraron las curvas de decaimiento de disoluciones con diferentes concentraciones de los analitos en las condiciones químicas e instrumentales óptimas. La máxima intensidad luminiscente aparece representada frente a la concentración de los analitos en la figura A.13, mientras que la figura A.14 ilustra únicamente los intervalos lineales, ajustados a rectas mediante el método de mínimos cuadrados. Como puede constatarse contemplando estas figuras, ambos compuestos presentan una respuesta lineal en el intervalo comprendido entre 1,0 y 750,0 μ g L⁻¹, con coeficientes de la determinación muy cercanos a la unidad.

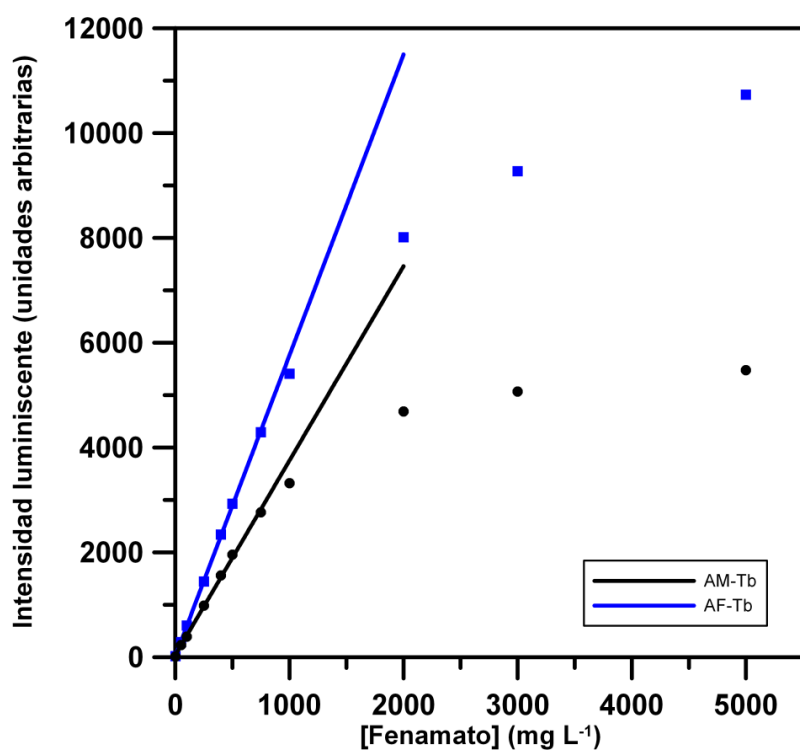
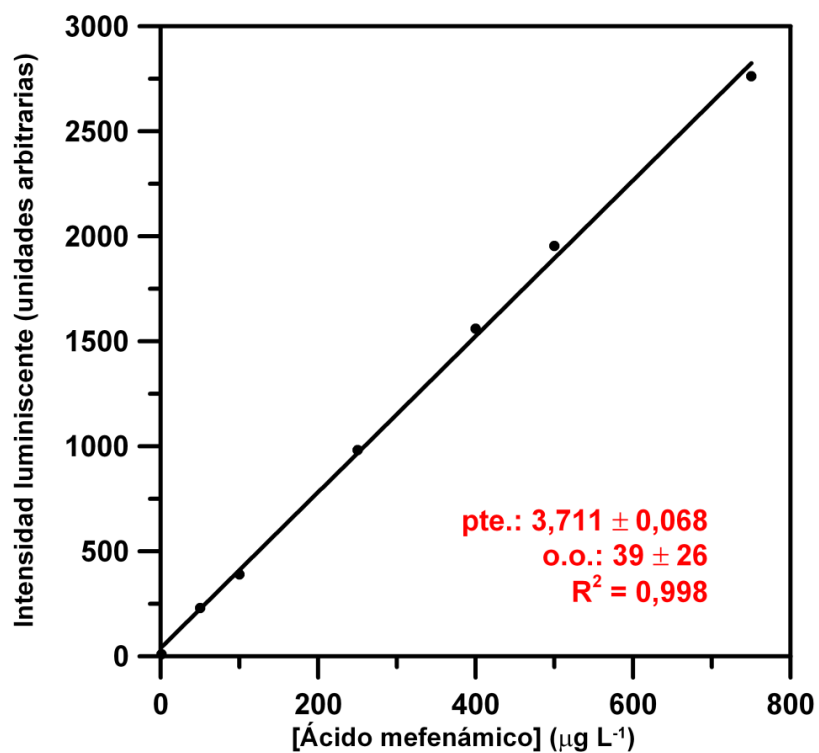


Figura A.13. Estudio de linealidad entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de los complejos AM-Tb y AF-Tb.



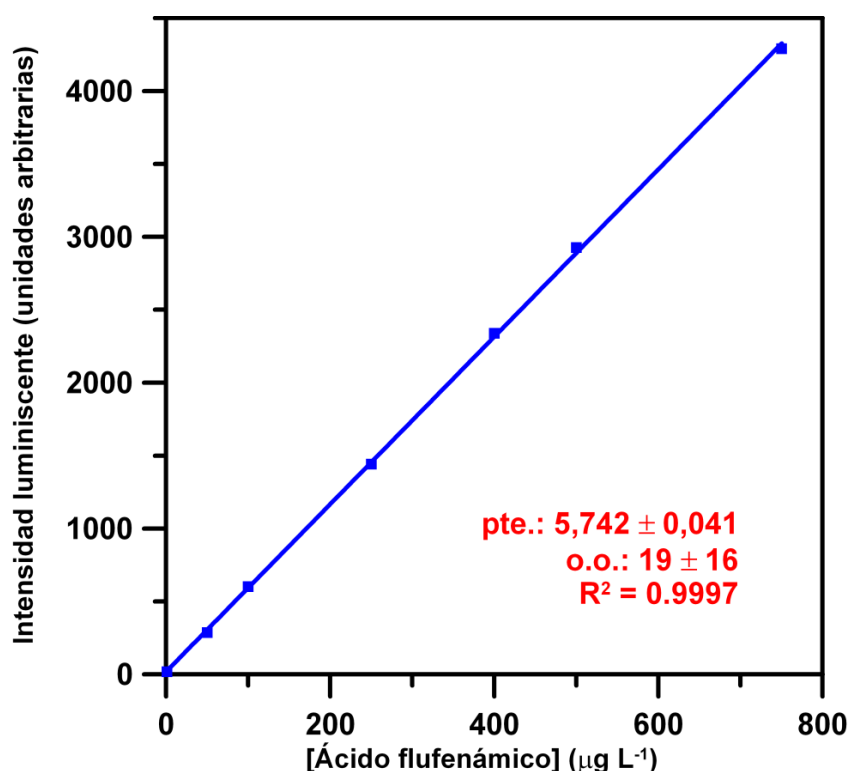


Figura A.14. Intervalos de respuesta lineal entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de los complejos AM-Tb(arriba) y AF-Tb (abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

A.5. Aplicación del modelo PLS-1

A.5.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración

Teniendo en cuenta los intervalos de linealidad obtenidos así como la intensidad luminiscente relativa de los dos complejos, se decidió diseñar la matriz de calibración multivariante de tal manera que las concentraciones máximas fueran $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido flufenámico y $400,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido mefenámico (puesto que la luminiscencia del complejo AF-Tb es más intensa). De esta manera, la contribución de ambos analitos en las curvas de calibración será similar.

El diseño de la matriz de calibración es un paso fundamental para poder obtener una buena capacidad de resolución en los análisis. Es importante evitar colinealidades, así como abarcar un intervalo amplio de concentraciones con el mínimo número de muestras, elegidas convenientemente siguiendo criterios estadísticos. Se consideró que el diseño factorial con tres niveles por factor combinado con un diseño central compuesto (trece muestras de calibración, en total) era el más adecuado para mezclas binarias, ya que incluye información de las curvas de decaimiento no sólo de los complejos individuales sino también de diferentes mezclas a niveles de concentración tanto altos como bajos. Se incluyó asimismo un blanco analítico (véanse la tabla A.7 y la figura A.15) con el fin de maximizar estadísticamente la información contenida en las curvas de decaimiento.

<i>Tabla A.7. Concentraciones de los analitos en cada punto de la matriz de calibración.</i>		
Muestra	[Ácido mefenámico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ácido flufenámico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	58,0	22,0
2	200,0	22,0
3	342,0	22,0
4	58,0	75,0
5	200,0	75,0
6	342,0	75,0
7	58,0	128,0
8	200,0	128,0
9	342,0	128,0
10	0	75,0
11	400,0	75,0
12	200,0	0
13	200,0	150,0
14	0	0

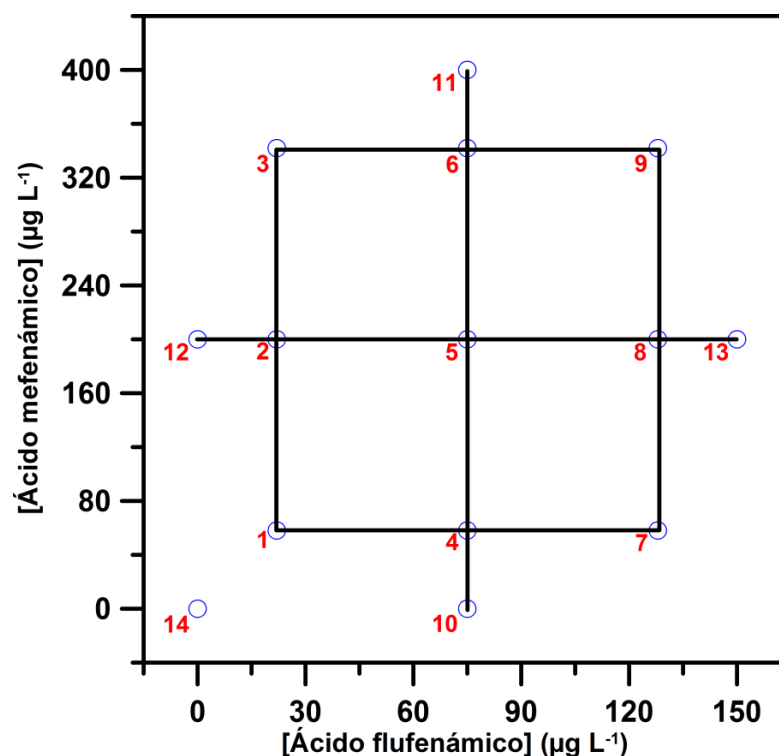


Figura A.15. Representación gráfica del esquema utilizado en la matriz de calibración.

Se registraron las curvas de decaimiento luminiscente de las catorce muestras en las condiciones químicas e instrumentales óptimas. Estas curvas aparecen representadas en la figura A.16.

A continuación, dichas curvas se exportaron a archivos de texto que pudiera abrir y reconocer la subrutina MVC-1 de Matlab [252]. Se aplicó el algoritmo PLS-1, puesto que se ha demostrado que resulta ser el más ventajoso [274]. A fin de obtener el mejor modelo de calibración posible, se estudió el número de factores, los intervalos temporales a introducir y la posible presencia de puntos discrepantes. Asimismo, finalmente el modelo constó de tres blancos analíticos, ya que de esta forma su capacidad predictiva mejoraba notablemente.

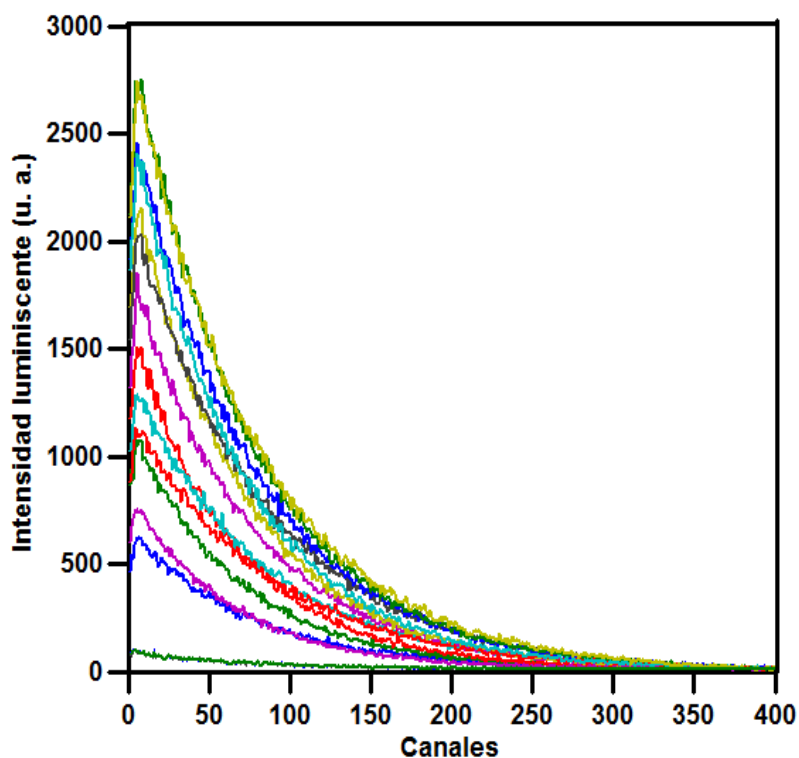


Figura A.16. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

La optimización del número de factores para cada analito se llevó a cabo mediante el método de validaciones cruzadas, introduciendo inicialmente en la subrutina de Matlab un valor de cuatro factores, que, previsiblemente, será mayor que el necesario. Según el criterio de Haaland y Thomas [238] (el número óptimo de factores es aquél por el cual la probabilidad para la razón F (P) es igual o menor que 0,75), el número óptimo de factores es dos para ambos componentes, tal y como era de esperar de una mezcla binaria.

Asimismo, se ensayaron diversos intervalos de las curvas de decaimiento introducidas en la matriz ya que, aunque la subrutina MVC-1 permite trabajar con la curva de decaimiento completa, a veces esto no resulta ventajoso por considerar zonas que no contienen información relevante acerca de los analitos en estudio, de tal forma que los resultados obtenidos pueden verse influenciados negativamente. Los mejores resultados estadísticos (R^2 más cercano a la unidad y errores SEP y REP lo más bajos

posible) se obtuvieron cuando se analizó el intervalo de puntos comprendido entre el canal 1 y el 200, tanto para el complejo AM-Tb como para el complejo AF-Tb.

Por último, se constató que no existía ningún punto discrepante, ya que la razón F fue en todos los casos inferior a la unidad [238]. Los resultados estadísticos de la etapa de la calibración aparecen resumidos en las tablas A.8 y A.9.

Tabla A.8. Optimización del número de factores (canales del 1 al 200).

Número de factores	Ácido mefenámico			Ácido flufenámico		
	PRESS	F	p	PRESS	F	p
0	339610	139,18	0,999	47576	162,87	0,999
1	201110	82,42	0,999	7992,3	27,36	0,999
2	2840,9	1,16	0,617	292,11	1	0,499
3	2440,1	1	0,499	297,85	0	0
4	2530,0	0	0	317,39	0	0

Tabla A.9. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R ²
Ácido Mefenámico	2	13	8,2	0,990
Ácido Flufenámico	2	4,3	7,0	0,993

A.5.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)

Utilizando el programa de generación de números aleatorios [253], se prepararon diez muestras con concentraciones de ambos analitos comprendidas dentro de los intervalos de calibración y repartidas dentro de los mismos. Estas muestras se

analizaron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, obteniéndose las curvas de la figura A.17.

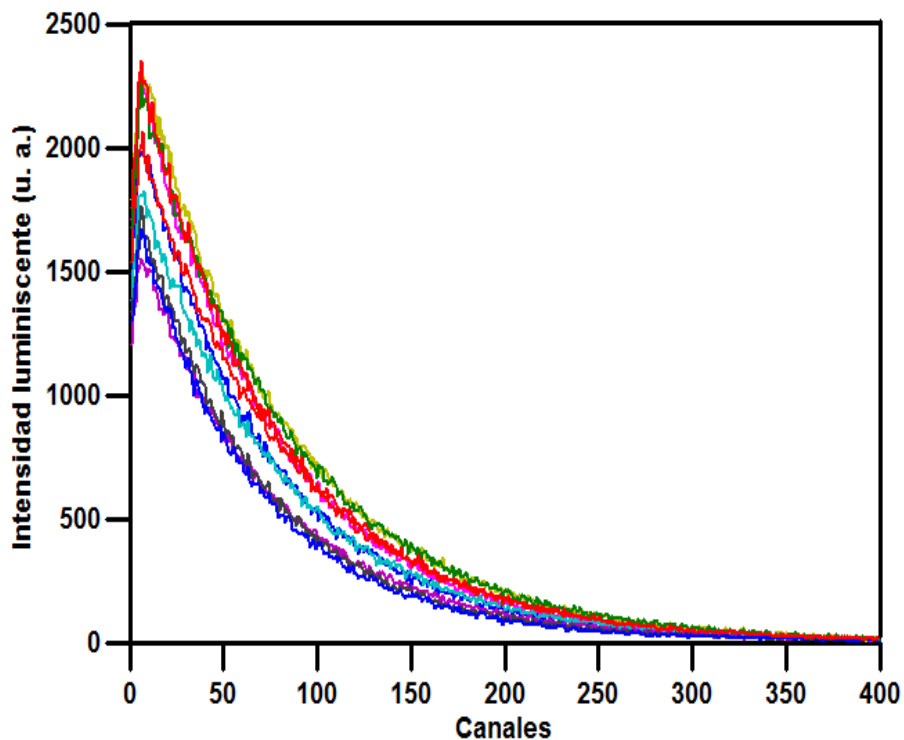


Figura A.17. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

A fin de validar el método, se utilizó la matriz de calibración desarrollada previamente para calcular el contenido en fenamatos de cada una de las muestras de predicción. Los resultados obtenidos se hallan recogidos en las tablas A.10 y A.11. En ellas puede observarse que en todos los casos el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra próximo al 100 %.

Tabla A.10. Predicción del contenido en ácido mefenámico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	s_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	298,0	300,5	6,6	1,9	100,8
2	272,0	284,0	7,5	2,0	104,4
3	102,0	112,2	7,0	1,7	110,0
4	180,0	173,2	6,3	2,1	96,2
5	196,0	203,0	5,4	2,1	103,6
6	136,0	140,7	8,3	2,0	103,4
7	328,0	328,2	7,2	2,5	100,0
8	340,0	351,9	7,7	2,6	103,5
9	70,0	72,1	9,3	2,2	102,9
10	250,0	264,3	7,6	2,0	105,7

Tabla A.11. Predicción del contenido en ácido flufenámico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	s_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	75,0	72,0	1,6	1,9	96,0
2	99,0	95,0	1,8	2,0	96,0
3	120,0	117,0	1,8	1,7	97,5
4	87,0	88,2	1,5	2,1	101,3
5	62,0	61,8	1,3	2,1	99,6
6	136,0	135,0	2,1	2,0	99,3
7	42,0	42,5	1,9	2,5	101,2
8	32,0	32,5	2,1	2,6	101,5
9	140,0	142,4	2,4	2,2	101,7
10	110,0	102,4	1,8	2,0	93,0

Cuando se representaron las concentraciones de los analitos que el modelo PLS-1 predice frente a las añadidas, se obtuvo una tendencia marcadamente lineal (ver figura A.18).

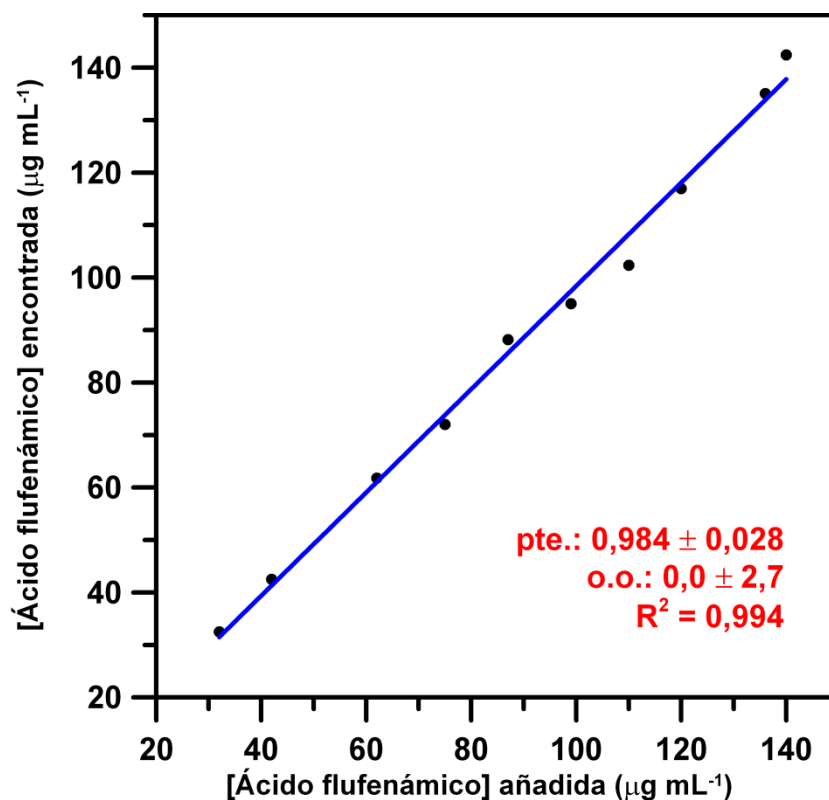
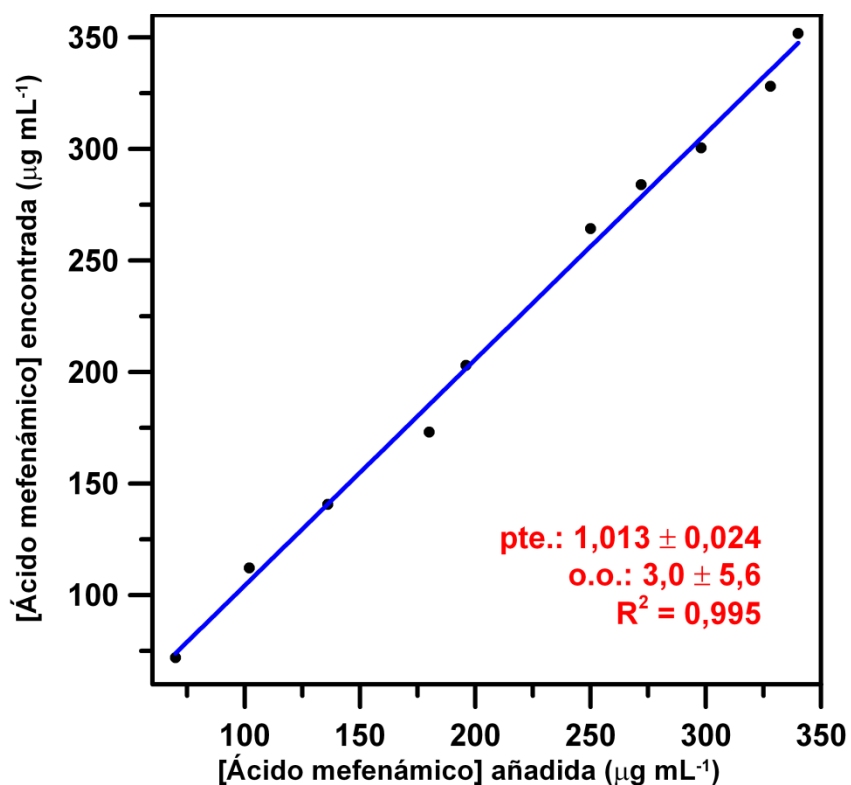


Figura A.18. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido flufenámico(abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

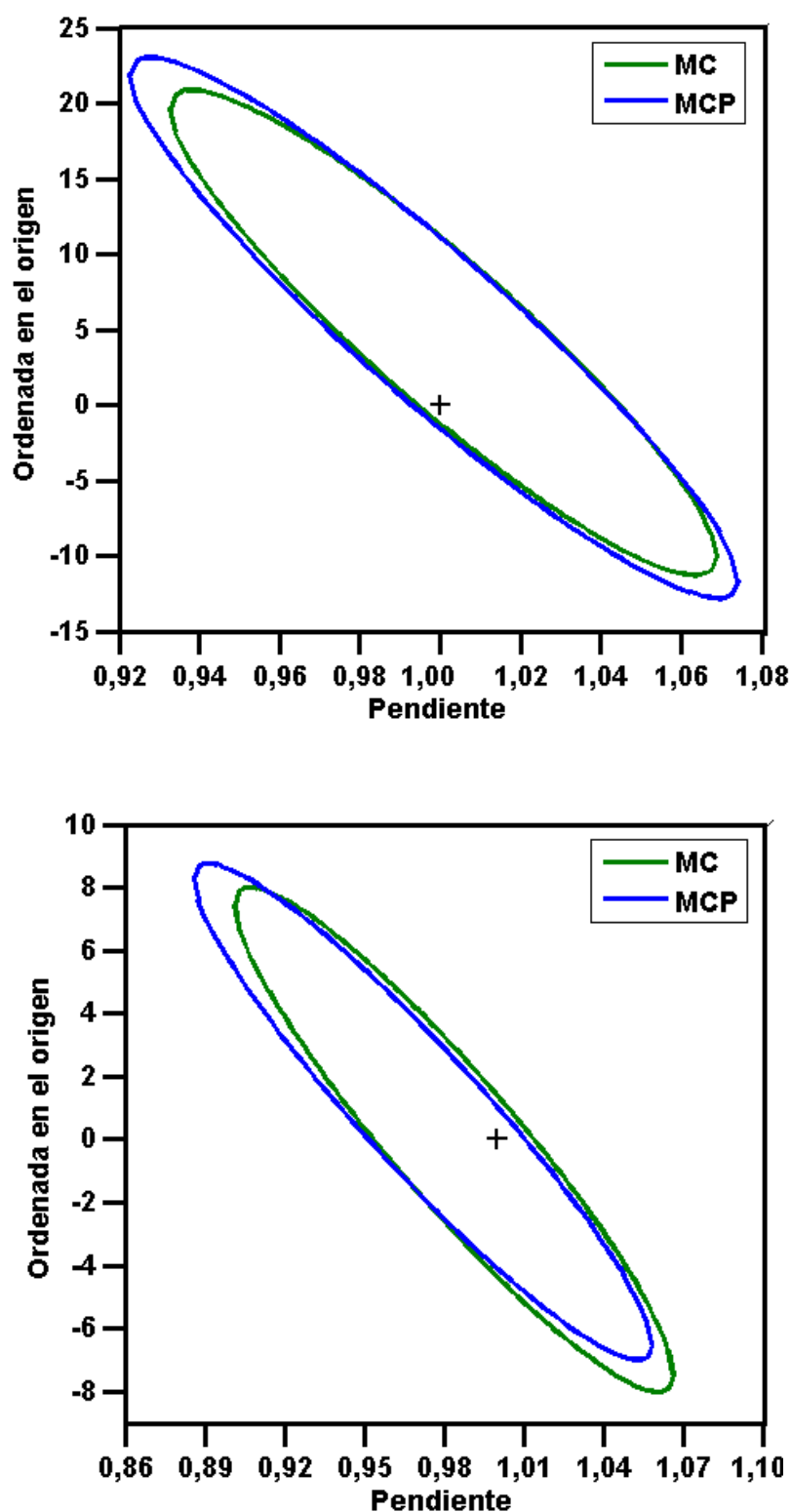


Figura A.19. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para el ácido mefenámico (arriba) y el ácido flufenámico (abajo), considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (azul).

Indicativo de la gran calidad del ajuste es el hecho de que las rectas obtenidas al representar los valores de concentración encontrada frente a concentración añadida tienen como pendiente un valor próximo a la unidad y como ordenada en el origen un número cercano al 0. De hecho, para ambos analitos, las diferencias entre los valores teóricos y experimentales de la pendiente y la ordenada en el origen no son estadísticamente significativas, ya que, como muestra la figura A.19, el punto (1,0) se encuentra dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen a un nivel de confianza del 95% [275].

A.6. Cálculo de los límites de detección

Los límites de detección se calcularon según el criterio desarrollado por nuestro grupo de investigación [224, 276], que, análogamente a las recomendaciones de la IUPAC [240], considera un factor de seguridad de tres, la desviación estándar de diez replicados del blanco analítico y la pendiente de la recta que relaciona las concentraciones de analito encontradas mediante la metodología de calibración multivariante y las añadidas.

En la tabla A.12 puede verse la desviación estándar de los diez replicados del blanco, la pendiente de la recta de las concentraciones añadidas frente a las concentraciones encontradas y el límite de detección calculado para cada uno de los analitos.

<i>Tabla A.12. Cálculo de los límites de detección (LD).</i>			
Analito	S_b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	b	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ácido mefenámico	4,9	1,0	3,7
Ácido flufenámico	1,22	0,98	14,61

Los valores calculados para los límites de detección son los esperados en la determinación de fenamatos mediante métodos basados en luminiscencia sensibilizada por terbio [40].

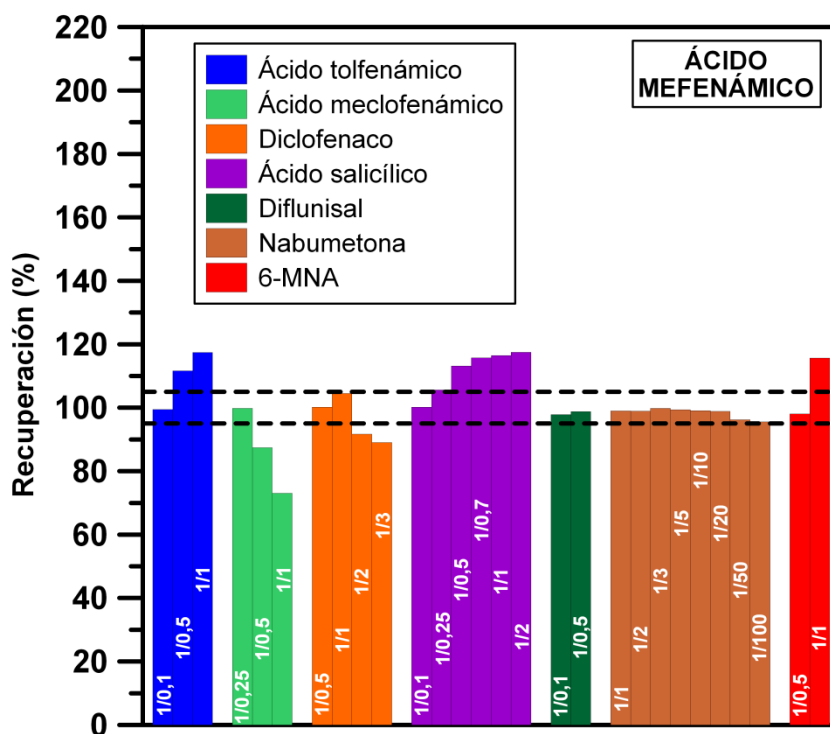
A.7. Estudio de la precisión del método

A fin de llevar a cabo un estudio de la precisión del método propuesto, se preparó, registró y predijo una serie de diez replicados de una disolución que contenía $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido mefenámico y $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido flufenámico. Como refleja la tabla A.13, las concentraciones medias estimadas fueron $304,9 \pm 5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $38,9 \pm 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para los ácidos mefenámico y flufenámico, respectivamente, lo cual es indicativo de la alta precisión que tiene el método.

<p><i>Tabla A.13. Predicción de diez replicados de una muestra que contenía $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido mefenámico y $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido flufenámico.</i></p>		
Muestra	[Ácido mefenámico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ácido flufenámico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	297,8	40,3
2	306,4	37,6
3	301,3	38,9
4	311,9	36,6
5	308,2	37,4
6	298,7	40,2
7	311,5	38,1
8	308,5	39,9
9	306,8	39,8
10	298,2	40,3
Valor medio	$304,9 \pm 5,5$	$38,9 \pm 1,4$

A.8. Estudio de la selectividad del método

Se comprobó el efecto que tiene en la determinación de los ácidos mefenámico y flufenámico por el método propuesto la presencia de otros compuestos pertenecientes a la familia de los AINEs. Para ello, se registraron y predijeron muestras sintéticas que contenían $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ambos fenamatos en estudio y cantidades variables del posible interferente. Se comenzó siempre con la proporción 1/1 y se subió o bajó dependiendo de si aparecía interferencia o no. En la figura A.20 se muestran los resultados de forma que pueda verse qué muestras superaban un $\pm 5\%$ de error en su porcentaje de recuperación (criterio utilizado para decidir la proporción a la que un compuesto interfiere).



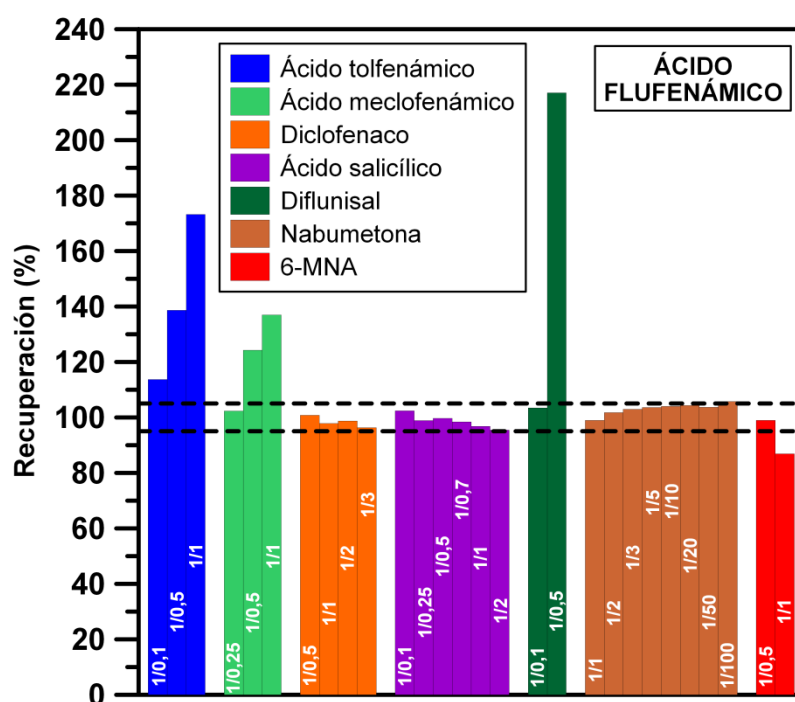


Figura A.20. Diagramas de barras para el estudio de interferencias en la determinación conjunta de ácido mefenámico (arriba) y de ácido flufenámico (abajo).

Como era de esperar, las mayores interferencias se deben a la presencia de compuestos de la propia familia de los fenamatos, es decir, a los ácidos tolfenámico y meclofenámico. La interferencia es mayor en la determinación del ácido flufenámico porque el tiempo de vida de su complejo con terbio es más parecido al de los ácidos tolfenámico (aproximadamente 1790 μ s) y meclofenámico (alrededor de 2000 μ s).

La nabumetona apenas interfiere, incluso a proporciones muy elevadas, pero sí su metabolito activo, el ácido 6-metoxi-2-naftilacético (6-MNA). Por su parte, el diclofenaco y el ácido salicílico dan lugar a una señal de fondo que interfiere en mayor medida con el ácido mefenámico (el tiempo de vida del ácido salicílico en estas condiciones es de aproximadamente 1200 μ s, más cercano al del ácido mefenámico que al del ácido flufenámico).

Por último, es muy llamativa la interferencia del diflunisal con el ácido flufenámico, pero no con el mefenámico. Este hecho se debe a que el diflunisal da lugar

a una señal extremadamente intensa, cuyo tiempo de vida resultó ser de unos 1890 μs , es decir, muy cercano al tiempo de vida del ácido flufenámico, pero alejado del del ácido mefenámico. La señal debida a la presencia de diflunisal fue tan alta que no pudo subirse la proporción más allá de 1/0,5 para comprobar si comenzaba a interferir con el ácido mefenámico, debido a que se produjo a una situación de saturación instrumental.

Todos los tiempos de vida a los que se hace referencia en este apartado se calcularon haciendo uso del algoritmo de Marquardt [247].

A.9. Aplicaciones del método propuesto

A.9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas

No se encontraron medicamentos que contuvieran en su composición a ambos fenamatos, pero sí pudieron adquirirse en una farmacia dos fármacos cuyos principios activos eran ácido mefenámico y ácido flufenámico, respectivamente:

- **Coslan** (PARKE-DAVIS, S.L.; fabricado por GÖDECKE, GmbH, Friburgo, Alemania) se encuentra comercializado en forma de cápsulas, cada una de las cuales contiene 250 mg de ácido mefenámico como principio activo. El contenido completo de una cápsula se disolvió en NaOH 0,01 mol L⁻¹ mediante agitación y 30 minutos de ultrasonidos. A continuación, la disolución se filtró a través de un papel de filtro para análisis cuantitativo DP 145 125 (Albet) y se diluyó con NaOH 0,01 mol L⁻¹ hasta 500 mL en un matraz aforado. Se obtuvo así una disolución madre de 500,0 mg L⁻¹, a partir de la cual se preparó una dilución 1:250, la cual se usó como disolución de partida para las medidas.
- **Movilat Plus Gel** (Laboratorio STADA; fabricado por SANKYO PHARMA GmbH, Pfaffenhofen/Ilm, Alemania) es una pomada que contiene 3 g de ácido flufenámico y 2 g de ácido salicílico por cada 100 g (es decir, una proporción 1/0,7). Se pesaron 0,75 g de pomada y los principios activos se disolvieron en

NaOH 0,01 mol L⁻¹ mediante agitación, 30 minutos de ultrasonidos y calor (30 °C). La disolución se filtró a continuación en un matraz aforado de 250 mL que se enrasó con NaOH 0,01 mol L⁻¹, obteniéndose una disolución de 90,0 mg L⁻¹ de ácido flufenámico y 60,0 mg L⁻¹ de ácido salicílico, la cual se diluyó 50 veces para preparar la disolución de partida para los análisis.

Se prepararon tres muestras diferentes de cada una de estas medicinas, y a continuación se diluyeron con el fin de que las concentraciones de los fenamatos estuvieran incluidas en el intervalo lineal del método desarrollado. Se analizaron tanto muestras que contenían sólo uno de los analitos, como muestras que contenían ambos (preparadas adicionando cantidades adecuadas de un patrón del fenamato que no estuviera presente en la composición del medicamento correspondiente). Las disoluciones resultantes se midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, y se predijo las concentraciones de los analitos en cada muestra mediante PLS. Los resultados, expresados como porcentaje de recuperación medio de los tres replicados de cada muestra analizados se encuentran resumidos en la tabla A.14.

Tabla A.14. Resultados del análisis de muestras de preparaciones farmacéuticas que contenían ácido mefenámico y/o ácido flufenámico.								
Preparación farmacéutica	[Analito] nominal (µg L ⁻¹)		[Analito] añadido (µg L ⁻¹)		[Analito] encontrada (µg L ⁻¹)		Recuperación (%)	
	AM	AF	AM	AF	AM	AF	AM	AF
Coslan	210,0	-	0	0	210,3	-	100,2	-
	370,0	-	0	70,0	370,9	71,6	100,2	102,3
Movilat	-	90,0	0	0	35,1	92,4	-	102,6
	-	90,0	100,0	0	122,6	90,2	122,6	100,2

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el análisis de las disoluciones de Coslan son en todos los casos próximos al 100%, lo cual indica que las concentraciones de analito calculadas concuerdan totalmente con el contenido nominal en ácido

mefenámico de la preparación farmacéutica, cuyo principio activo puede, además, determinarse sin problemas en presencia de ácido flufenámico.

El contenido en ácido flufenámico de Movilat puede también determinarse sin ningún problema. Sin embargo, se obtienen grandes errores al determinar simultáneamente ácido mefenámico. Este hecho se debe a la presencia de ácido salicílico, el cual, como se estudió en el apartado anterior, en una proporción aproximada de 1/0,7 no interfiere en la determinación de ácido flufenámico pero sí en la de ácido mefenámico.

A.9.2. Aplicación a muestras de orina humana

La orina humana no presenta fluorescencia nativa a las longitudes de onda utilizadas en este trabajo [277]. Sin embargo, su presencia da lugar a un intenso efecto matriz que interfiere en la determinación de los ácidos flufenámico y mefenámico y, por tanto, se decidió desarrollar un método de calibración diferente para determinar en orina los fenamatos en estudio. Dicho método hizo uso de un diseño central compuesto para tres componentes en la matriz de calibración, de tal forma que la influencia de la orina quedara recogida en el desarrollo del modelo PLS-1. Sin embargo, la orina interfería de tal manera que no pudo desarrollarse un modelo que asegurara una capacidad predictoria suficiente (en la predicción se cometían errores incluso superiores al 50% en la gran mayoría de casos). Por tanto, se decidió abordar la determinación de fenamatos en orina mediante una estrategia alternativa.

En ensayos preliminares, se comprobó que si se representaban las concentraciones de ácido flufenámico o de ácido mefenámico predichas en muestras de orina utilizando el modelo desarrollado en ausencia de orina frente a las concentraciones añadidas, se obtenía una línea recta siempre que la dilución de orina utilizada fuera la misma en todas las muestras. Se pensó que esta recta podría utilizarse como método de predicción si se diera el caso de que fuera siempre la misma con independencia del origen de la orina.

Para comprobar si esto era así en la práctica, se tomaron a primera hora de la mañana muestras de orina de tres personas sanas a las que no se había administrado ningún tipo de medicamento. Dichas muestras se centrifugaron durante quince minutos y a partir de ellas se prepararon diluciones 1:100 utilizando agua destilada.

A continuación, se prepararon cinco muestras sintéticas que contenían concentraciones variables de los ácidos flufenámico y mefenámico y una dilución 1:250 de una de las orinas recogidas. Estas tres series de muestras se analizaron en las condiciones químicas e instrumentales optimizadas, y se predijeron utilizando el modelo PLS desarrollado, obteniéndose los resultados de la tabla A.15.

<i>Tabla A.15. Resultados del análisis de muestras sintéticas de orina que contenían ácido mefenámico y ácido flufenámico.</i>								
Muestra	[Analito] ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	Añadida		Predicha en orina 1		Predicha en orina 2		Predicha en orina 3	
	AM	AF	AM	AF	AM	AF	AM	AF
1	200,0	35,0	210,7	17,2	202,8	19,2	206,7	18,2
2	310,0	42,0	293,5	22,4	300,7	19,9	295,7	21,1
3	292,0	80,0	285,3	43,6	281,8	45,4	280,1	45,0
4	150,0	100,0	170,6	54,3	177,5	55,6	174,0	54,9
5	120,0	135,0	143,6	75,1	149,4	74,4	144,2	75,2

Los datos se ajustaron a líneas rectas mediante el método de mínimos cuadrados, tal y como puede verse en la figura A.21.

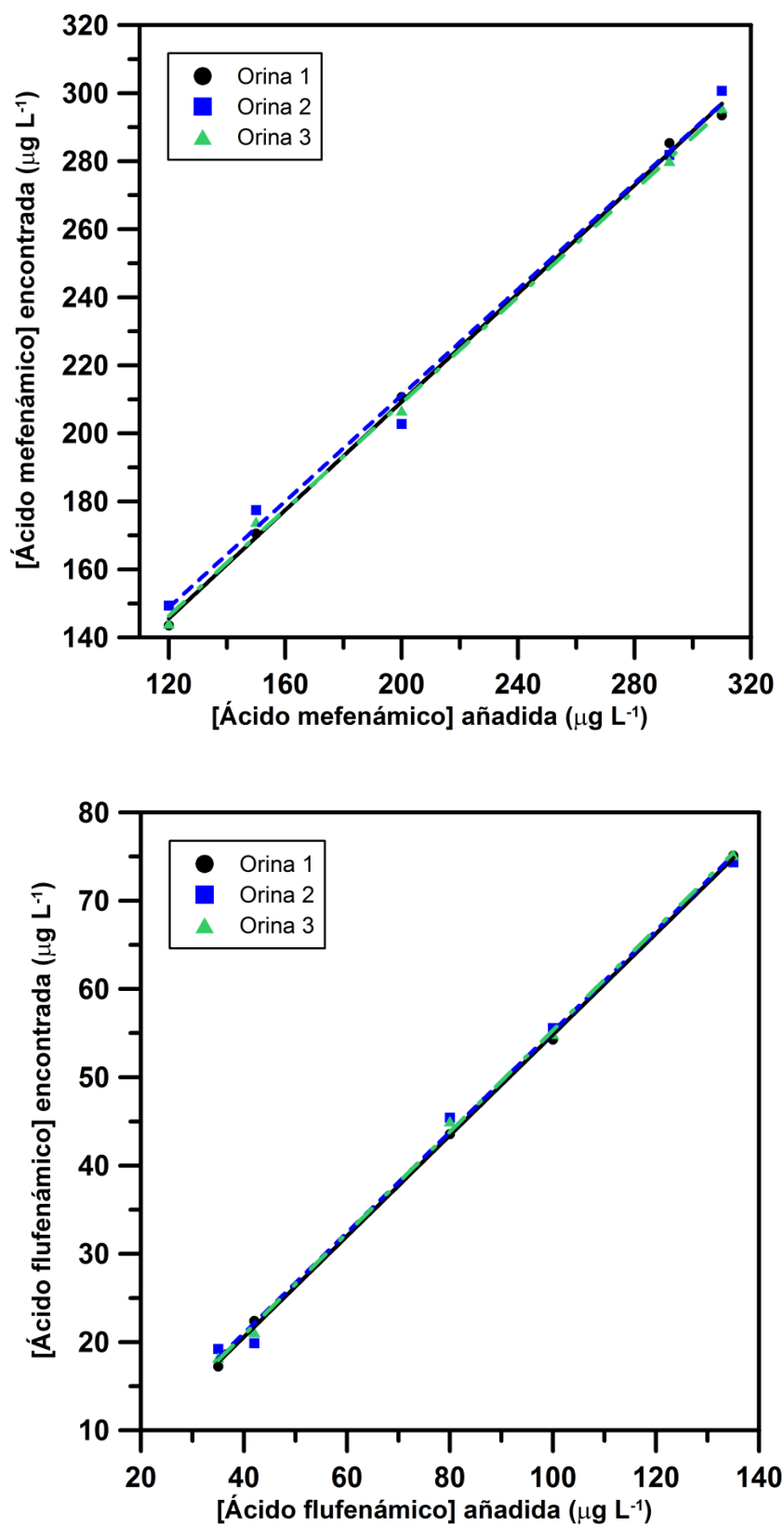


Figura A.21. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido flufenámico(abajo) en tres muestras diferentes de orina.

La figura A.22 muestra las rectas de calibración globales, obtenidas mediante mínimos cuadrados.

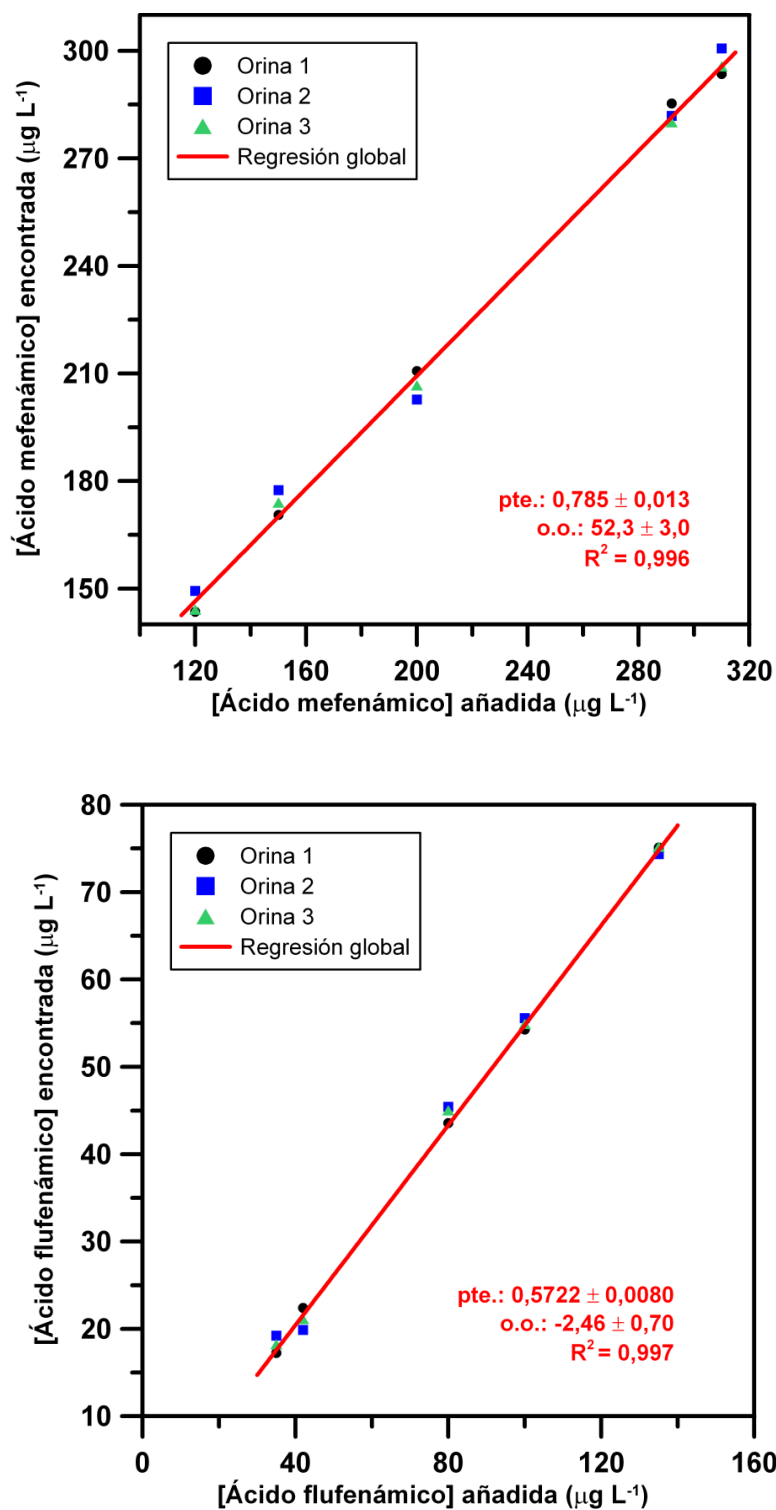


Figura A.22. Rectas globales de calibración para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido flufenámico(abajo) obtenidas mediante mínimos cuadrados.

Con la finalidad de evaluar la viabilidad de las rectas de regresión globales, así como si existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres series de datos, se llevó a cabo un análisis de varianza. Los valores obtenidos para los estadísticos F' y F'' se muestran en la tabla A.16.

<i>Tabla A.16. Valores de los estadísticos F' y F'' obtenidos en el análisis de varianza.</i>		
	F'	F''
Valor teórico (95% confianza)	3,63	4,26
Ácido mefenámico	0,223	0,161
Ácido flufenámico	0,0539	0,00172

Como en todos los casos los valores experimentales son menores que los valores teóricos, se cumplen las dos hipótesis del análisis de varianza, de tal manera que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres series de datos y, por tanto, las rectas globales pueden usarse en la predicción de las concentraciones de ácido flufenámico y de ácido mefenámico en orina.

B. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO MEFENÁMICO Y ÁCIDO TOLFENÁMICO

El procedimiento seguido para la determinación simultánea de los ácidos mefenámico y tolfenámico fue análogo al que se ha expuesto para el caso de la mezcla de ácido mefenámico y ácido flufenámico.

B.1. Antecedentes bibliográficos

En bibliografía puede encontrarse gran cantidad de métodos para determinar tanto ácido tolfenámico como ácido mefenámico, dado su gran interés farmacológico. Sin embargo, no son tan numerosos los trabajos en los que se determina ambos compuestos.

- La mayor parte de ellos se basan en una separación por **cromatografía líquida** para determinar simultáneamente ácido tolfenámico y ácido mefenámico en plasma [293-295, 325, 326], suero sanguíneo [297, 325, 326], orina [297, 298], orina equina [301], leche [306, 327, 328], hígado de cerdo [329], preparados farmacéuticos [297, 298] y muestras forenses [304]. También pueden encontrarse métodos que hacen uso de la **cromatografía de gases** para determinar dichos fenamatos en orina [311, 312], orina equina [302, 303], plasma equino [302, 309] y muestras de agua [315, 330].
- En cuanto a **electroforesis capilar**, sólo hay descrito un método. Concretamente, utiliza isotacoforesis capilar y detección conductimétrica [289] para determinar los fenamatos en fármacos.

- La formación de **complejos con terbio** por parte de ácidos tolfenámico y mefenámico se estudió por primera vez en 1998 [39] en suero. Los límites de detección fueron $1,4 \cdot 10^{-8}$ y $9,0 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹ para ácido mefenámico y tolfenámico, respectivamente, y los porcentajes de recuperación se encontraban en torno al 100%. Mediante el uso de TOPO como coligando y Tritón X-100 como surfactante, Arnaud y col. [40] disminuyeron los límites de detección a $2 \cdot 10^{-9}$ y $5 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹ para ácido mefenámico y tolfenámico, respectivamente. Este último trabajo también determina ácido flufenámico y flurosemida, con límites de detección de $2 \cdot 10^{-10}$ y $5 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹, respectivamente. Sin embargo, no se abordan determinaciones simultáneas.

En consecuencia, todavía no se ha descrito ningún método que utilice como señal analítica las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos entre los ácidos mefenámico y tolfenámico y el terbio para la determinación de los analitos, ni por separado ni en mezclas. La calibración multivariante tampoco se ha usado hasta la fecha para la determinación simultánea de ambos analitos.

B.2. Estabilidad de las disoluciones

A partir de los correspondientes hidrocloruros, se prepararon disoluciones madre de ácido mefenámico y de ácido tolfenámico 50,0 mg L⁻¹ en NaOH 0,01 mol L⁻¹, disoluciones que se conservaron a 4°C y en la oscuridad. Se constató que ambos analitos en disolución eran estables durante un mínimo de tres semanas mediante la medida de la intensidad de luminiscencia del pico a 548 nm de sus complejos con el terbio (λ_{exc} = 289 nm). Por su parte, las disoluciones de trabajo, preparadas a partir de las disoluciones madre, resultaron ser estables durante al menos una hora.

B.3. Optimización secuencial de variables

Todas las variables que influyen en las curvas de decaimiento luminiscente de los complejos entre los analitos y el terbio se optimizaron secuencialmente, tal y como se expone a continuación.

B.3.1. Optimización de variables químicas

Como muestra la tabla B.1, de nuevo se tomaron los valores indicados por Arnaud y Georges [40] como variables químicas de partida.

<i>Tabla B.1. Parámetros químicos iniciales.</i>	
[Tb³⁺]	10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
[TOPO]	5·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
% Tritón X-100	0,05 % v/v

Durante todo el proceso de optimización las concentraciones de los analitos se fijaron en 200,0 µg L⁻¹, y las longitudes de onda de medida de fueron 286 nm para la excitación y 546 nm para la emisión.

B.3.1.1. pH de la disolución

El pH de las disoluciones se varió entre 2,0 y 11,0 adicionando HCl o NaOH, y se observó cómo se reflejaban estos cambios en la intensidad de las curvas de decaimiento luminiscente así como en los tiempos de vida de los dos complejos en estudio. Los resultados de este estudio se muestran en la figura B.1 y en la tabla B.2.

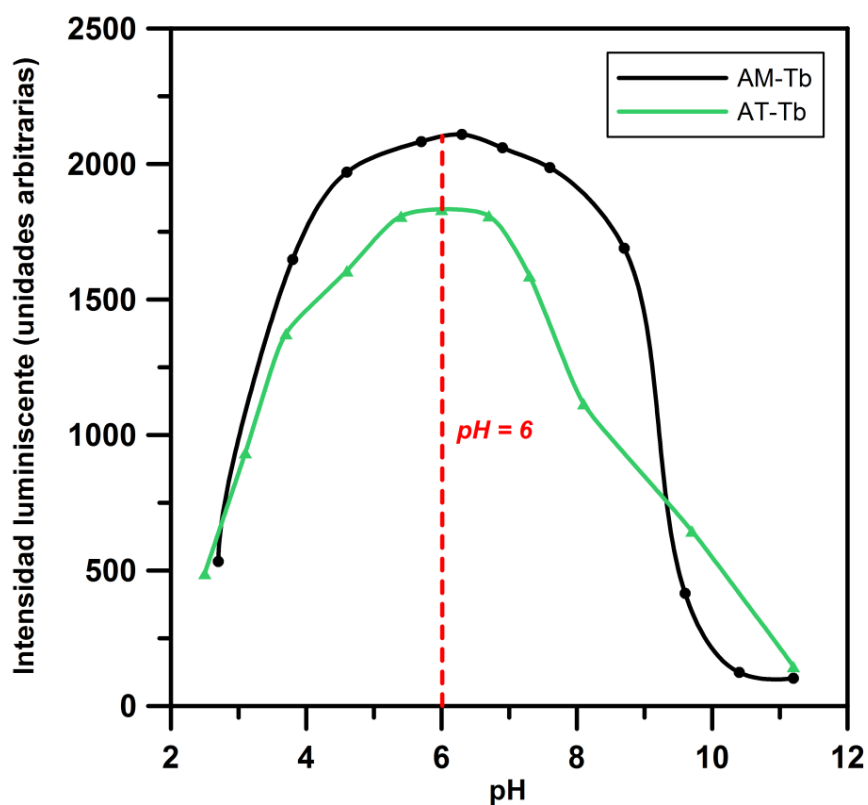


Figura B.1. Influencia del pH en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

Tabla B.2. Influencia del pH en la intensidad máxima de luminiscencia y en los tiempos de vida de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

AM-Tb			AT-Tb		
pH	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)	pH	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)
2,7	607	1280	2,5	489	1646
3,8	1893	1219	3,1	935	1778
4,6	2264	1332	3,7	1374	1804
5,7	2423	1343	4,6	1606	1770
6,3	2460	1350	5,4	1808	1792
6,9	2417	1349	6,0	1833	1859
7,6	2251	1291	6,7	1809	1832
8,7	1942	1282	7,3	1588	1802
9,6	535	1175	8,1	1116	1640
10,4	133	976	9,7	646	1472
11,2	112	870	11,2	146	1196

Obsérvese que, aunque la localización del pico máximo de luminiscencia no cambia, su intensidad va aumentando a medida que aumenta el pH. Sin embargo, a pH básico tiene lugar una brusca caída, debida, como ya se comentó, a la precipitación de hidróxido de terbio.

Los cálculos de los tiempos de vida son más fiables en los valores centrales de las curvas de la figura B.1, puesto que en los valores extremos la calidad de las curvas de decaimiento es muy inferior. A pH intermedios la diferencia entre el tiempo de vida de ambos complejos se encuentra en torno a los 400 μ s, como ya se indicó al principio de este capítulo.

En conclusión, se escogió 6,0 como pH óptimo, puesto que a ese valor hay una mayor separación entre las curvas de decaimiento, las cuales presentan entonces, además, intensidades más elevadas.

B.3.1.2. Selección de la disolución reguladora y de su concentración óptima

Los resultados obtenidos en la selección del tampón para la determinación simultánea de los ácidos flufenámico y mefenámico justifica la elección del tampón ácido acético/acetato ($pK_a = 4,76$) para mantener constante el pH en la segunda mezcla de fenamatos estudiada. De nuevo el valor del pH óptimo se disminuyó ligeramente (hasta 5,4) con el fin de asegurar la capacidad reguladora máxima del tampón. Los datos de la tabla B.2 indican que esta decisión no perjudica en absoluto la determinación.

Se estudió el intervalo de concentraciones de tampón ácido acético/acetato comprendido entre 0,01 y 0,50 mol L⁻¹ (figura B.2) y se observó que a lo largo del mismo va disminuyendo la intensidad luminiscente, especialmente a partir de 0,15 mol L⁻¹ y para el complejo AM-Tb. En consecuencia, se escogió 0,1 mol L⁻¹ como concentración óptima de tampón, la cual supone un compromiso entre una capacidad reguladora adecuada y una intensidad luminiscente elevada. Ni la localización del

máximo de luminiscencia ni los valores de los tiempos de vida se vieron modificados en ningún momento de este estudio.

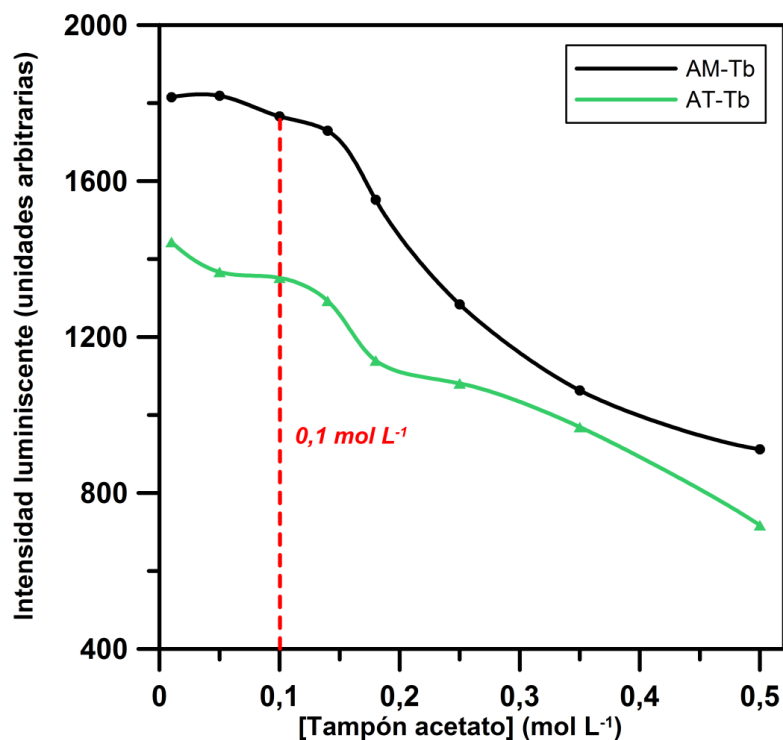


Figura B.2. Influencia de la concentración del tampón acetato en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

B.3.1.3. Optimización de la concentración de terbio

La figura B.3 refleja el cambio que se produjo en la intensidad máxima de luminiscencia al variar la concentración de la disolución de terbio entre $1 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. Obsérvese que, una vez alcanzado el valor máximo de intensidad luminiscente, dicha intensidad se mantiene aproximadamente constante en el intervalo estudiado. Como concentración de iones terbio óptima se eligió 10^{-3} mol L⁻¹. La oscilación en los valores calculados para los tiempos de vida no fue significativa.

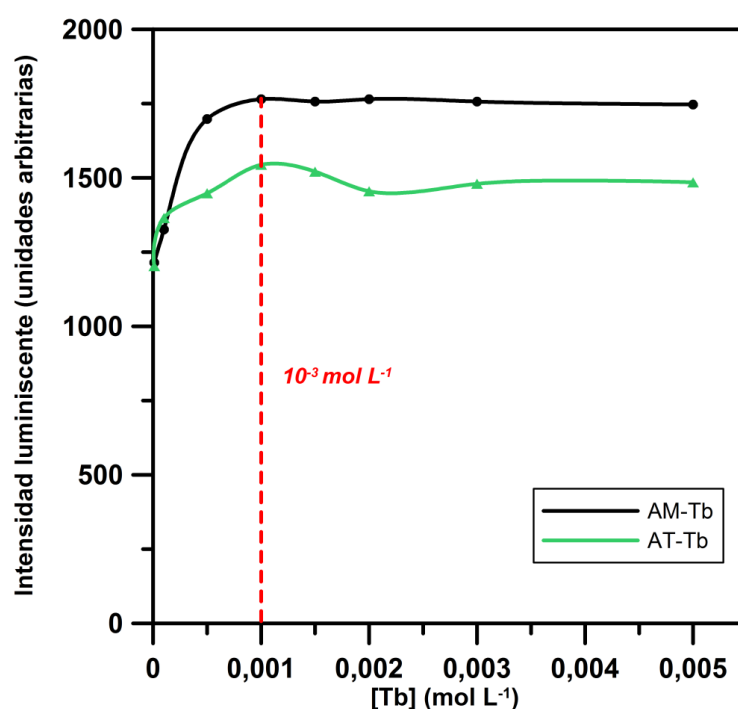


Figura B.3. Influencia de la concentración de Tb^{3+} en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

B.3.1.4. Optimización de la concentración de TOPO y del porcentaje de etanol

Como es de esperar, la presencia de un sensibilizador como el TOPO provoca un brusco aumento en la intensidad luminiscente (ver figura B.4). Se estudió el intervalo comprendido entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, obteniéndose el valor máximo y, por tanto, óptimo a 10^{-4} mol L⁻¹. Salvo a valores extremos, los tiempos de vida se mantienen aproximadamente constantes en todos los casos.

Asimismo, se estudió el porcentaje de etanol de las disoluciones entre el 1 y el 30 % v/v, como puede deducirse de la tabla B.3 y de la figura B.5. Si bien la localización del máximo de luminiscencia no cambia con el porcentaje de etanol, sí hay cambios notables tanto en su intensidad como en los tiempos de vida calculados. Se eligió como valor óptimo un 5% v/v de etanol, ya que éste proporciona la intensidad máxima.

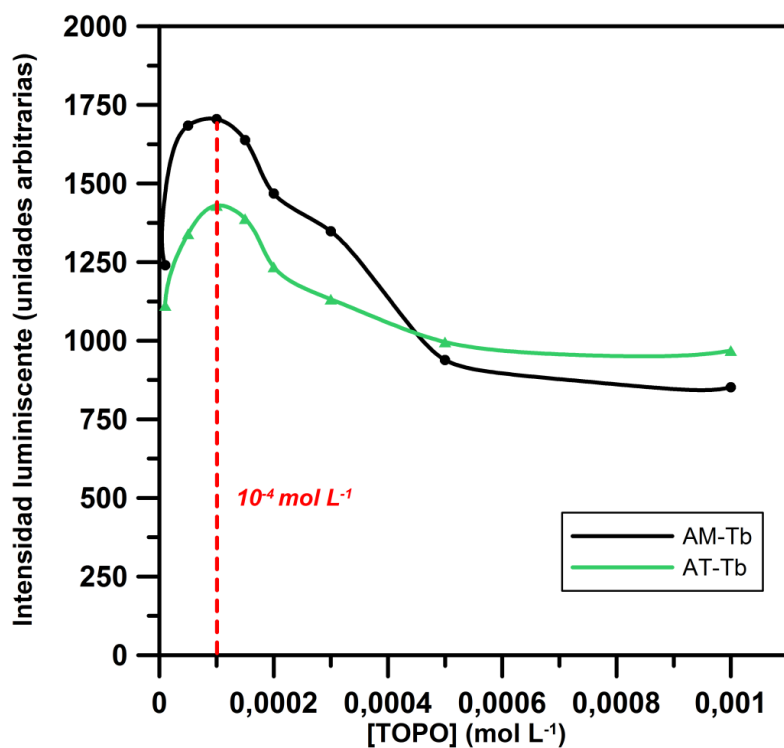


Figura B.4. Influencia de la concentración de TOPO en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

Tabla B.3. Influencia del porcentaje de etanol en la intensidad máxima de luminiscencia y en los tiempos de vida de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

EtOH (%)	AM-Tb		AT-Tb	
	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)	I _{máx} (u. a.)	τ (μs)
1	1802	1323	1358	1869
5	1886	1289	1416	1823
10	1698	1204	1273	1858
15	1287	1072	843	1607
20	342	962	136	285

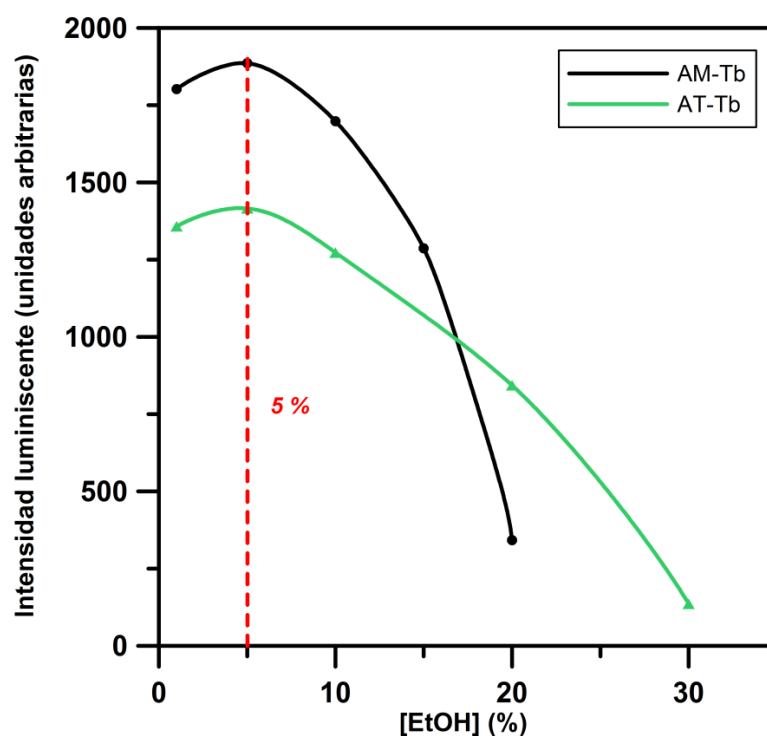


Figura B.5. Influencia del porcentaje de etanol en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

B.3.1.5. Optimización de la concentración de Tritón X-100

La figura B.6 demuestra que la presencia de surfactantes, como el Tritón X-100, favorece la emisión en métodos basados en luminiscencia sensibilizada por lantánidos. El estudio se efectuó en el intervalo comprendido entre 0,01 y 0,07 % v/v, eligiéndose como valor óptimo el que proporcionaba una intensidad mayor (0,04 % v/v). Excepto en el valor más bajo estudiado, los tiempos de vida no presentan diferencias sustanciales con respecto a los calculados en el apartado 3 de este capítulo.

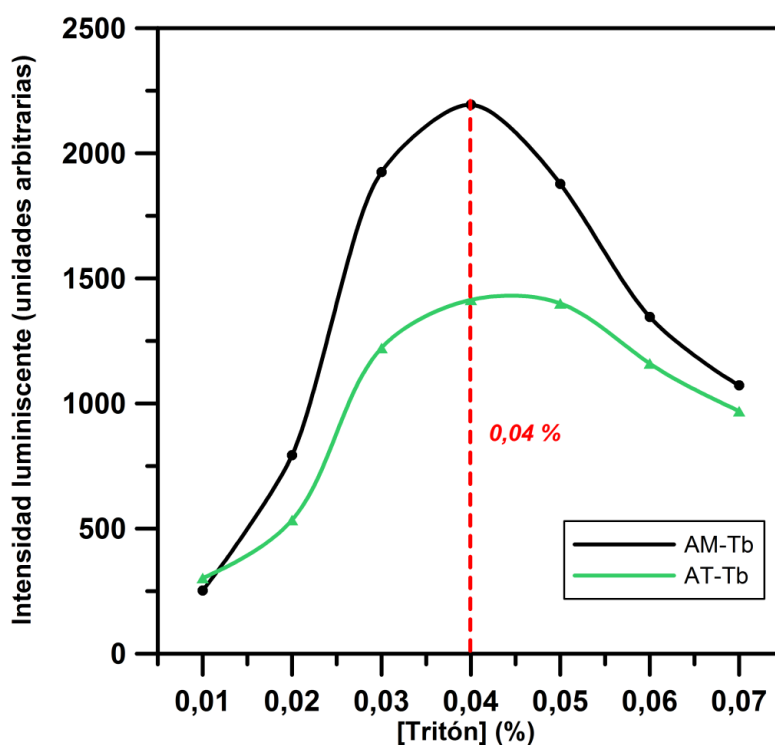


Figura B.6. Influencia la concentración de Tritón X-100 en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

B.3.1.6. Influencia de la temperatura

Como es de esperar, la señal luminiscente disminuye a medida que la temperatura aumenta. Se estudió el intervalo comprendido entre 5 y 40 °C (véase la figura B.7) y de nuevo se eligió 20 °C como temperatura óptima, puesto que, a pesar de que no proporciona la mayor intensidad luminiscente, se trata de un valor fácil y rápido de termostatar por encontrarse cercano a la temperatura ambiente.

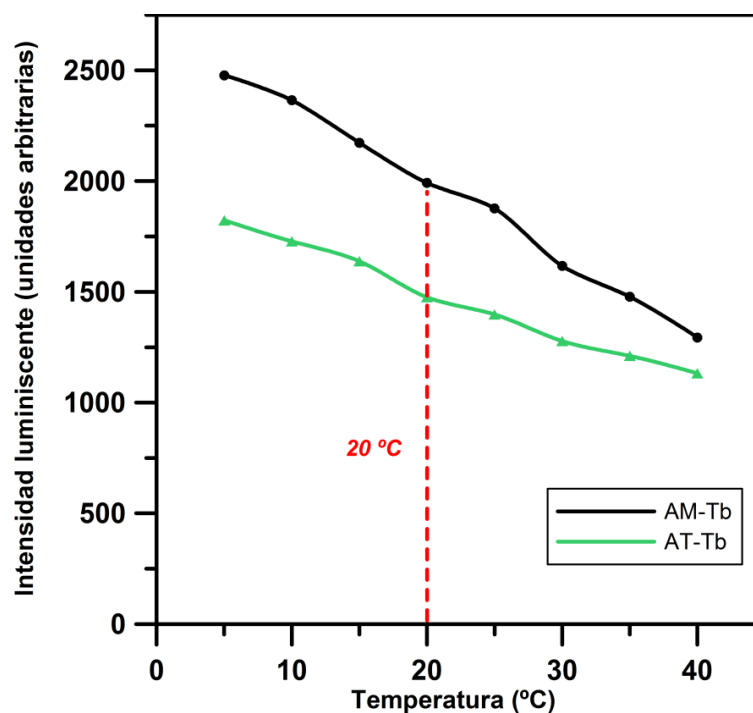


Figura B.7. Influencia de la temperatura en la luminiscencia de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

B.3.2. Optimización de variables instrumentales

De nuevo se tuvo en cuenta en este proceso el tiempo de registro de las curvas, la máxima intensidad luminiscente obtenida y la relación señal ruido. Las curvas de decaimiento luminiscente se registraron siempre entre 0 y 8500 μs , y a $\lambda_{\text{exc}} = 287 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$. Se utilizaron los valores optimizados anteriormente para las variables químicas y los valores iniciales para las variables instrumentales que indica la tabla B.4.

Tabla B.4. Parámetros instrumentales iniciales.

Tiempo de integración	400 μs
Número de disparos	11
Número de medias	3
Frecuencia	100 Hz
Número de canales	400

B.3.2.1. Optimización del tiempo de integración

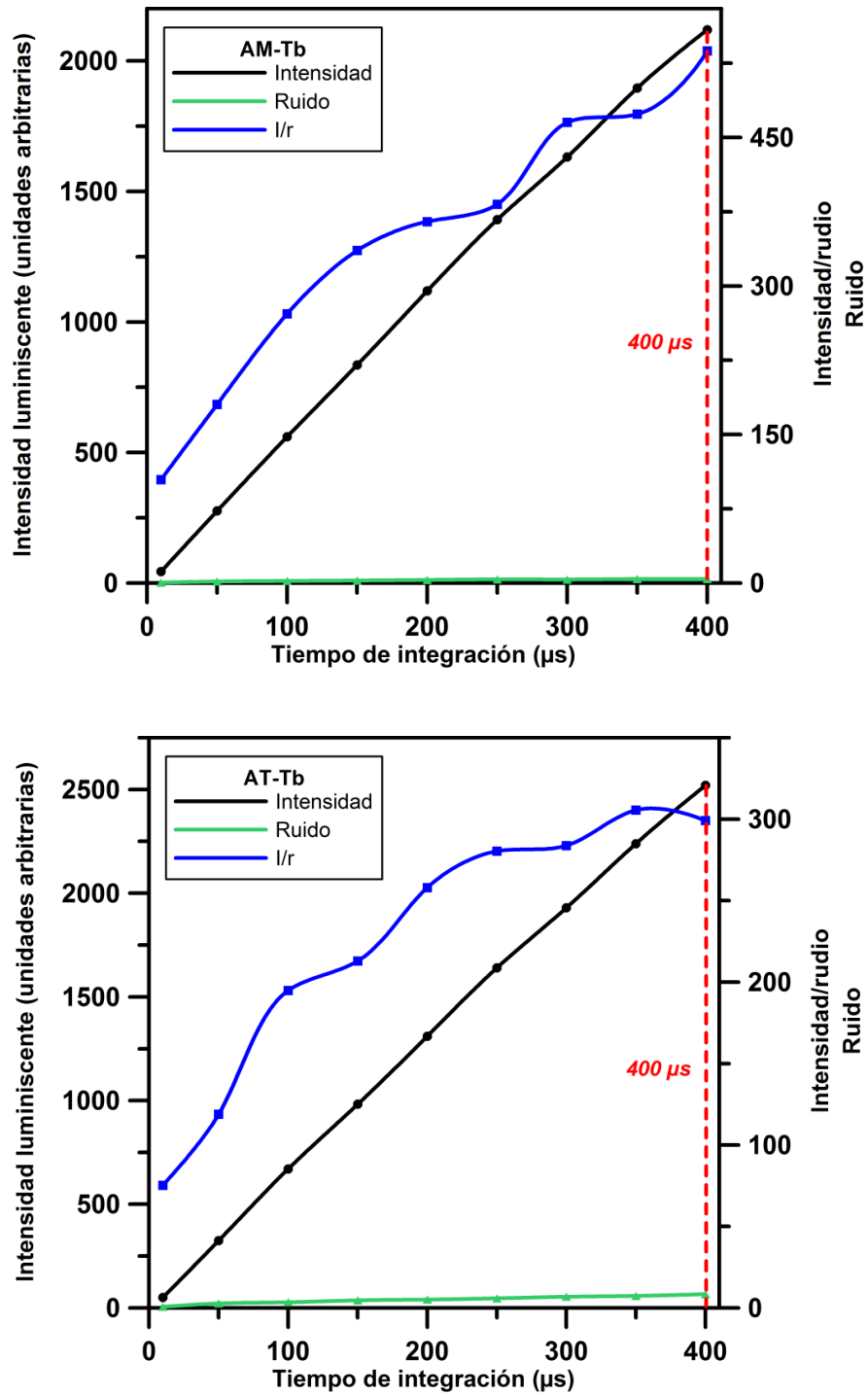


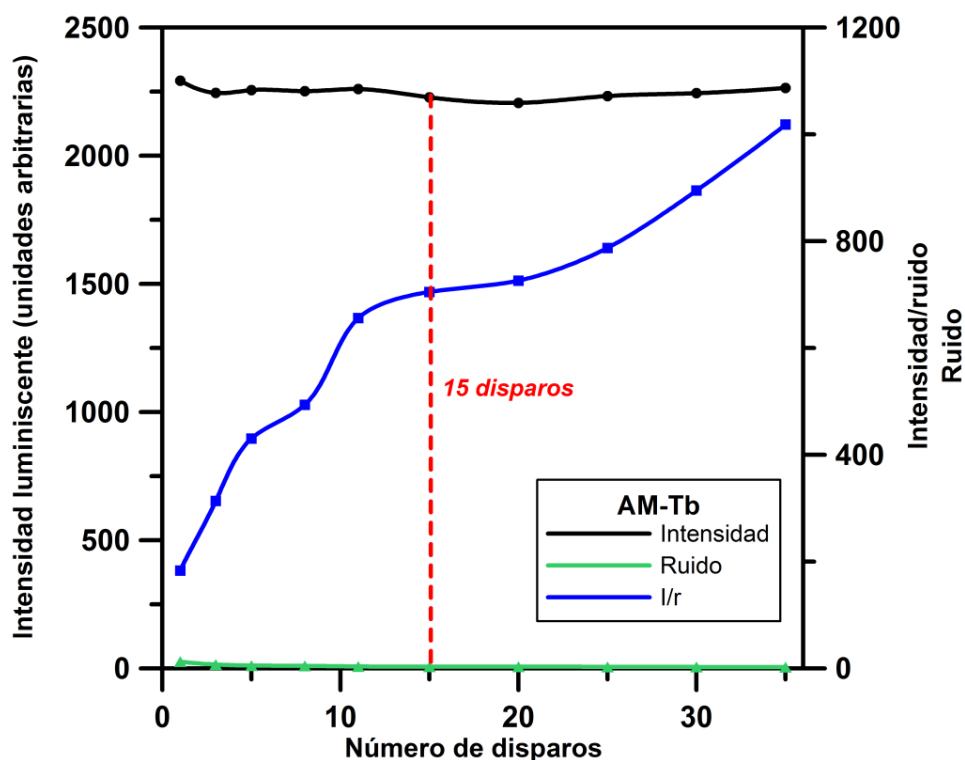
Figura B.8. Influencia del tiempo de integración en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AT-Tb (abajo).

La figura B.8 muestra el estudio de la influencia del tiempo de integración sobre la máxima señal luminiscente, estudio que se llevó a cabo entre los valores de 10 y 400 μs .

Como el tiempo de registro no depende del tiempo de integración, se decidió escoger como valor óptimo 400 μs , puesto que proporciona la máxima relación señal/ruido para el complejo AM-Tb y un valor también muy cercano al máximo de dicha relación para el complejo AT-Tb.

B.3.2.2. Optimización del número de disparos

Este parámetro se estudió entre 1 y 35 (véase la figura B.9.). Aunque en todo este intervalo la intensidad luminiscente se mantiene constante, el ruido instrumental disminuye al incrementar el número de disparos y, en consecuencia, la relación señal/ruido aumenta.



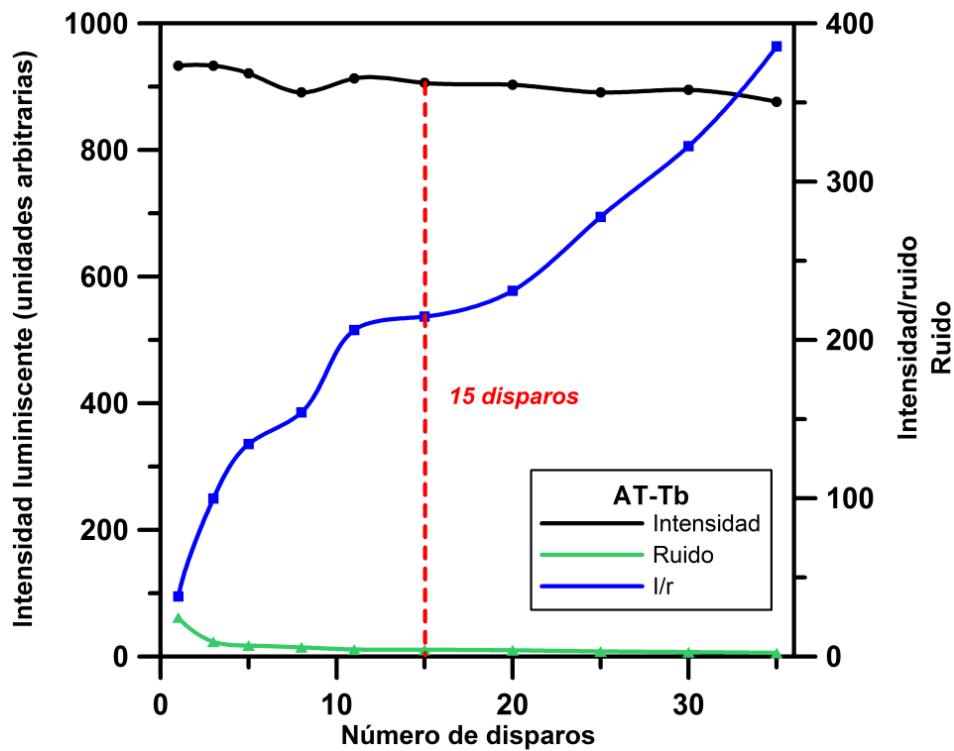


Figura B.9. Influencia del número de disparos de la lámpara en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AT-Tb (abajo).

Se escogió como valor óptimo 15 disparos. Aunque a valores superiores la relación señal/ruido es mayor, no se eligió como óptimo ninguno de estos valores porque implicaban tiempos de registro excesivamente elevados y, por razones estadísticas, es más conveniente alargar un análisis haciendo un mayor número de medias de cada curva registrada que aumentar el número de disparos.

B.3.2.3. Optimización del número de medias

Como ya se comentó anteriormente, el “número de medias” es el número de veces que el equipo registra cada curva de decaimiento luminiscente. En este trabajo se variaron las medias entre uno y ocho (ver figura B.10), escogiéndose cinco como valor óptimo a fin de no demorar excesivamente los análisis.

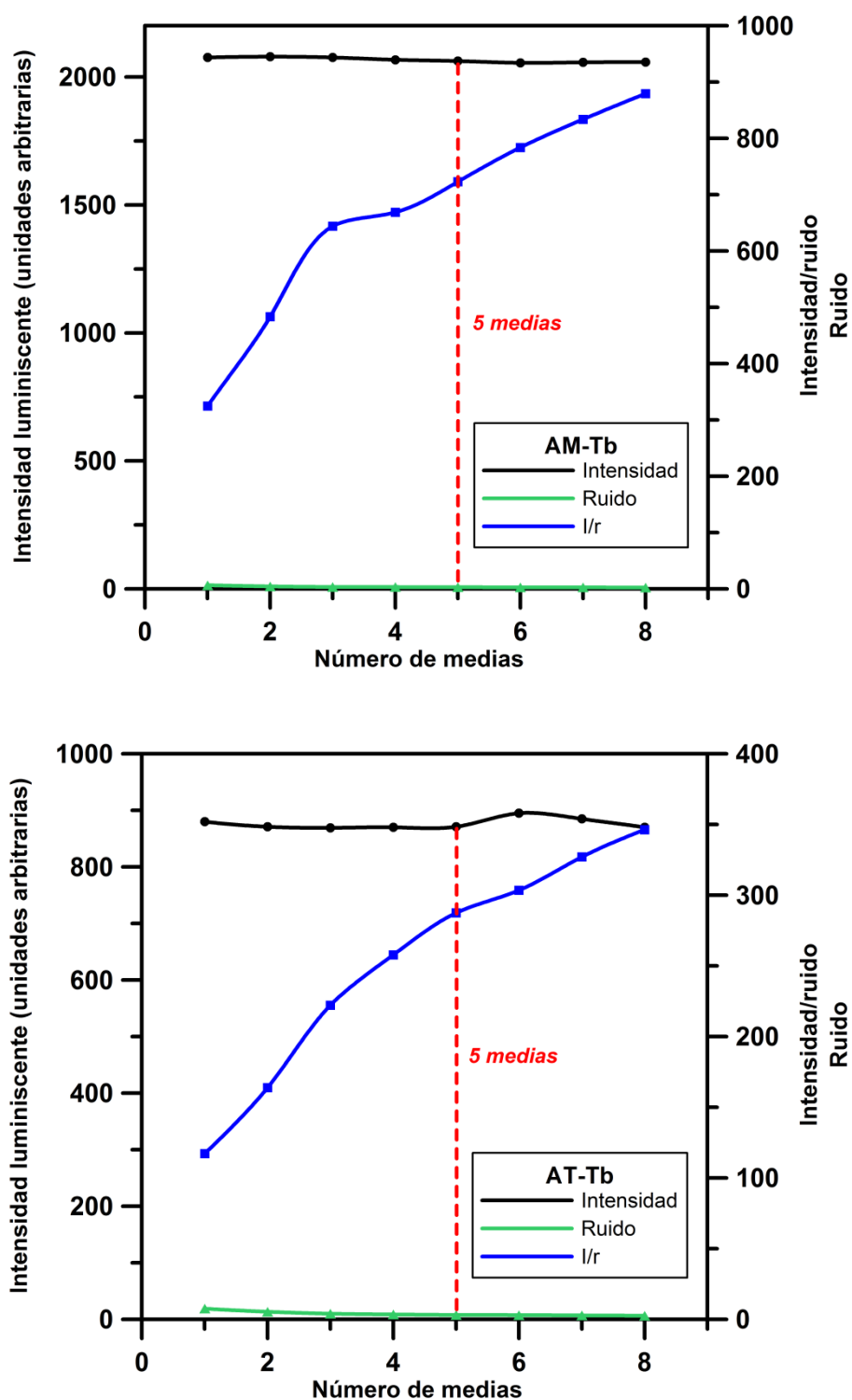


Figura B.10. Influencia del número de medias en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AT-Tb (abajo).

B.3.2.3. Optimización de la frecuencia de la lámpara

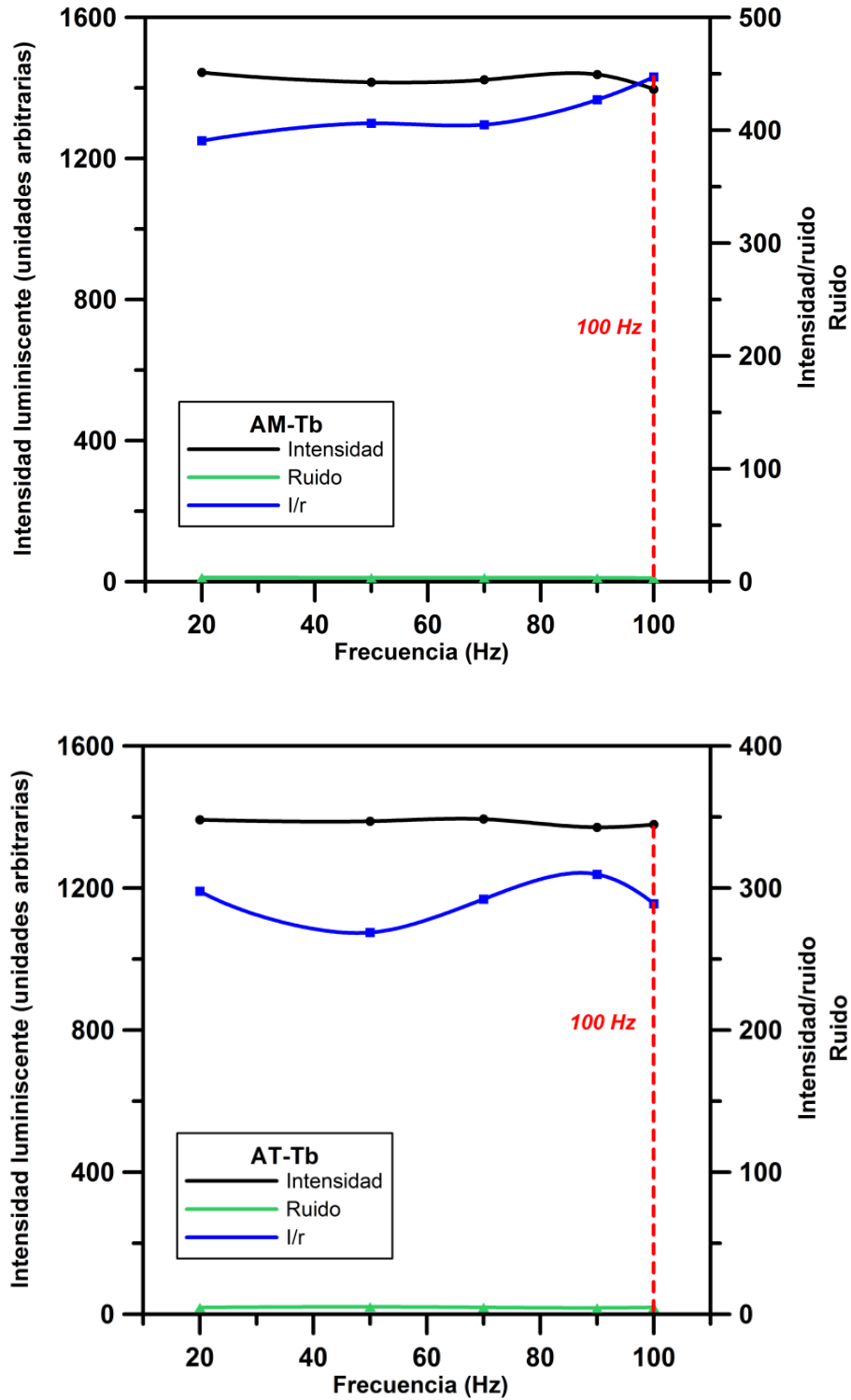


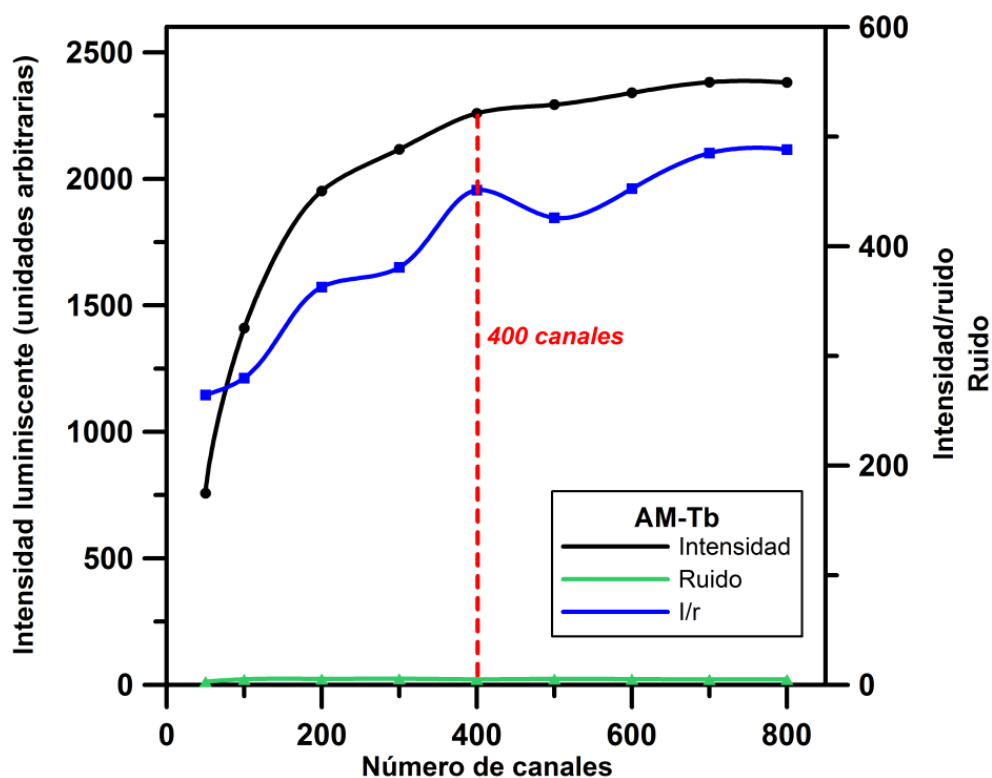
Figura B.11. Influencia de la frecuencia de destellos en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AT-Tb (abajo).

Cambios en la frecuencia, es decir, en el número de destellos de la lámpara por segundo, apenas tienen influencia ni en la máxima intensidad luminiscente ni en la relación señal/ruido, tal y como muestra la figura B.11. Se estudió el intervalo comprendido entre 20 y 100 Hz y se decidió escoger 100 Hz como valor de frecuencia óptimo porque implicaba tiempos de registro más cortos.

B.3.2.4. Optimización del número de canales

En este estudio se varió el número de canales, es decir, el número de puntos que el equipo registra para cada curva de decaimiento luminiscente, entre 50 y 800.

Puesto que la resolución de la curva es cada vez mayor cuantos más puntos experimentales se registren, la intensidad luminiscente aumenta con el número de canales, tal y como refleja la figura B.12. Tanto la relación señal/ruido como el tiempo de registro varían también de la misma forma. Para evitar tiempos de registro demasiado largos, se decidió elegir 400 canales como número óptimo.



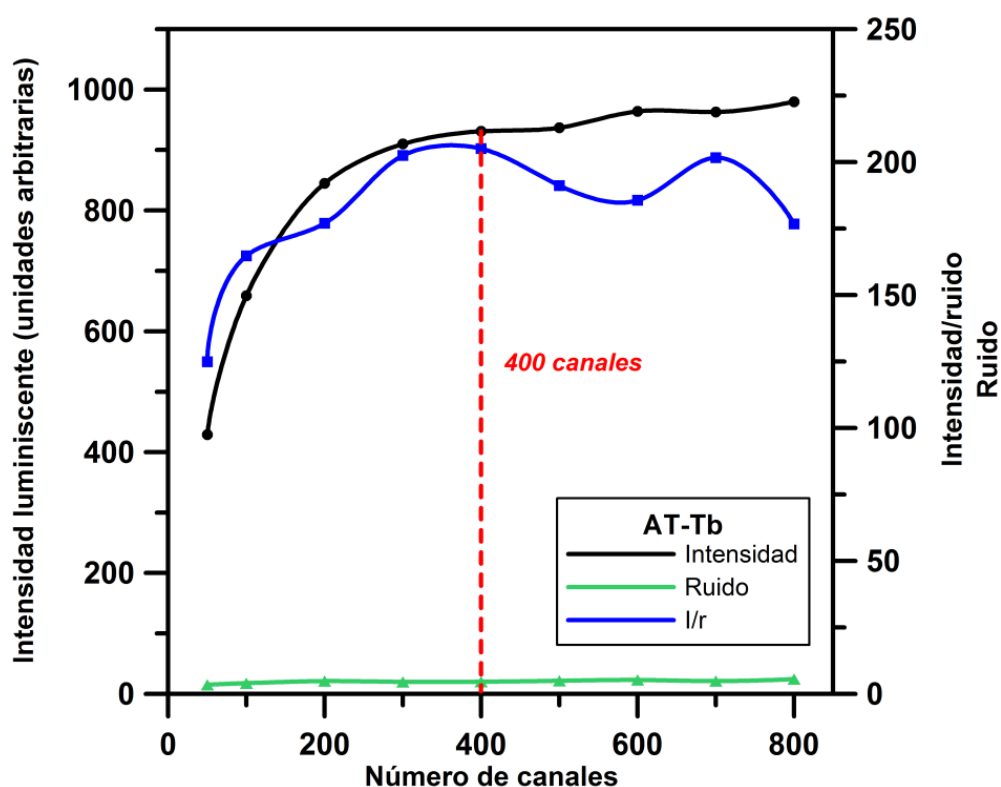


Figura B.12. Influencia del número de canales en la señal luminiscente de los complejos AM-Tb (arriba) y AT-Tb (abajo).

B.3.2.5. Selección del modo de adquisición

De nuevo se optó por registrar siempre las curvas de decaimiento en modo lineal, puesto que los compuestos estudiados en este trabajo no sufren fotodescomposición.

Las tablas B.5 y B.6 resumen los valores óptimos elegidos para todas las variables estudiadas, tanto químicas como instrumentales.

Tabla B.5. Valores óptimos escogidos para las variables químicas.

pH	5,4
[Tampón acetato]	0,1 mol L ⁻¹
[Tb³⁺]	10 ⁻³ mol L ⁻¹
[TOPO]	10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
% EtOH	5 % v/v
% Tritón X-100	0,04 % v/v
Temperatura	20 °C

Tabla B.6. Valores óptimos escogidos para las variables instrumentales.

Tiempo de integración	400 µs
Número de disparos	11
Número de medias	5
Frecuencia	100 Hz
Número de canales	400

B.4. Estudio de la linealidad

A la hora de aplicar el modelo de calibración multivariante PLS-1, es imprescindible estudiar si las respuestas instrumentales son lineales con respecto a las concentraciones de los analitos. Por ello, se llevó a cabo este estudio variando las concentraciones de ambos fenamatos entre 1,0 y 5000,0 µg L⁻¹ y midiendo la intensidad máxima de la curva luminiscente de cada disolución. Se utilizaron en todos los casos las condiciones químicas e instrumentales óptimas recogidas en las tablas B.5 y B.6. La figura B.13 muestra los resultados del estudio.

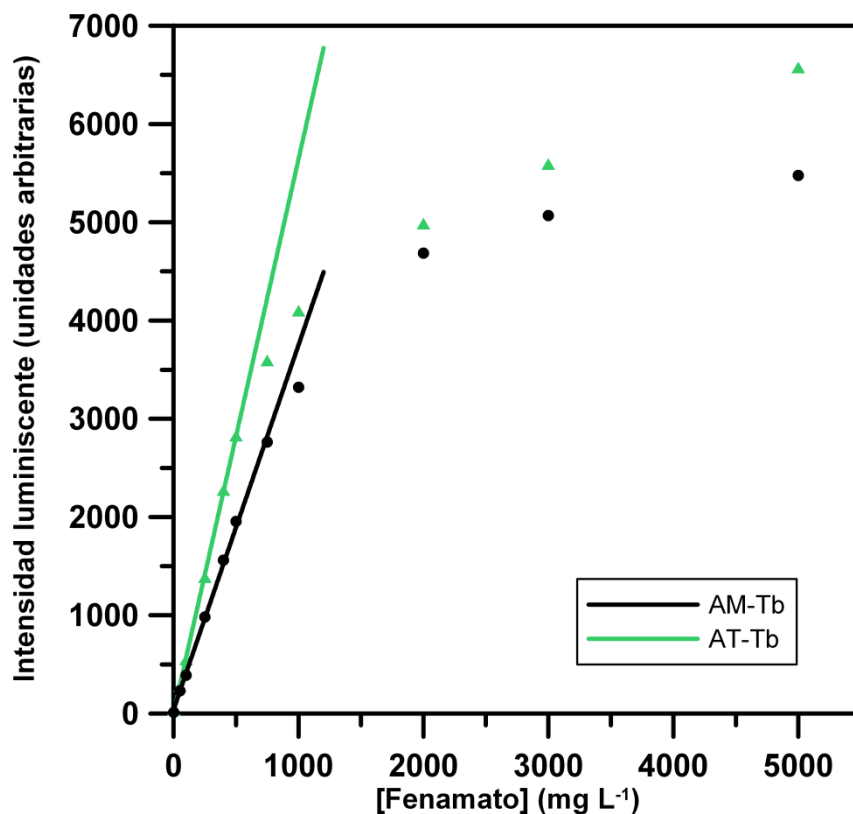


Figura B.13. Estudio de linealidad entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de los complejos AM-Tb y AT-Tb.

En la figura B.14 se hallan representados únicamente las zonas en las que la respuesta es lineal (entre 1,0 y 750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el caso del ácido mefenámico y entre 1,0 y 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido tolfenámico). Obsérvese que en ambos casos los coeficientes de la determinación (ajuste mediante mínimos cuadrados) son muy cercanos a la unidad.

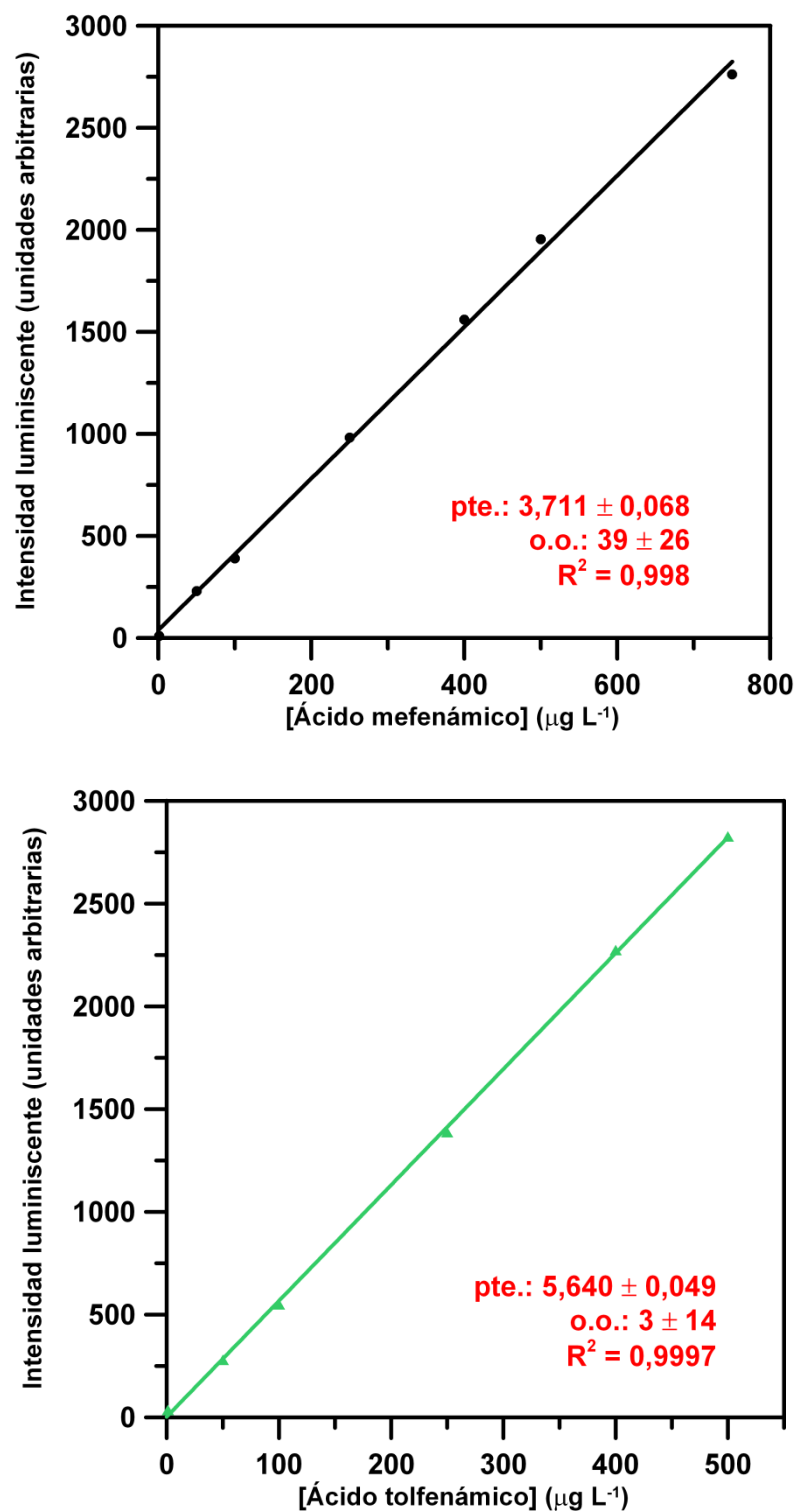


Figura B.14. Intervalos de respuesta lineal entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de los complejos AM-Tb(arriba) y AT-Tb (abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

B.5. Aplicación del modelo PLS-1

B.5.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración

Puesto que la luminiscencia del complejo AT-Tb es ligeramente más intensa, se decidió diseñar la matriz de calibración multivariante de tal manera que las concentraciones máximas fueran $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido tolfenámico y $400,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido mefenámico, a fin de obtener contribuciones similares de ambos analitos a las curvas de calibración. La figura B.15 y la tabla B.7 muestran que para la matriz de calibración se escogió un diseño factorial con tres niveles por factor combinado con un diseño central compuesto y un blanco analítico. Este diseño es el más adecuado para mezclas binarias, ya que maximiza estadísticamente la información contenida en las curvas de decaimiento.

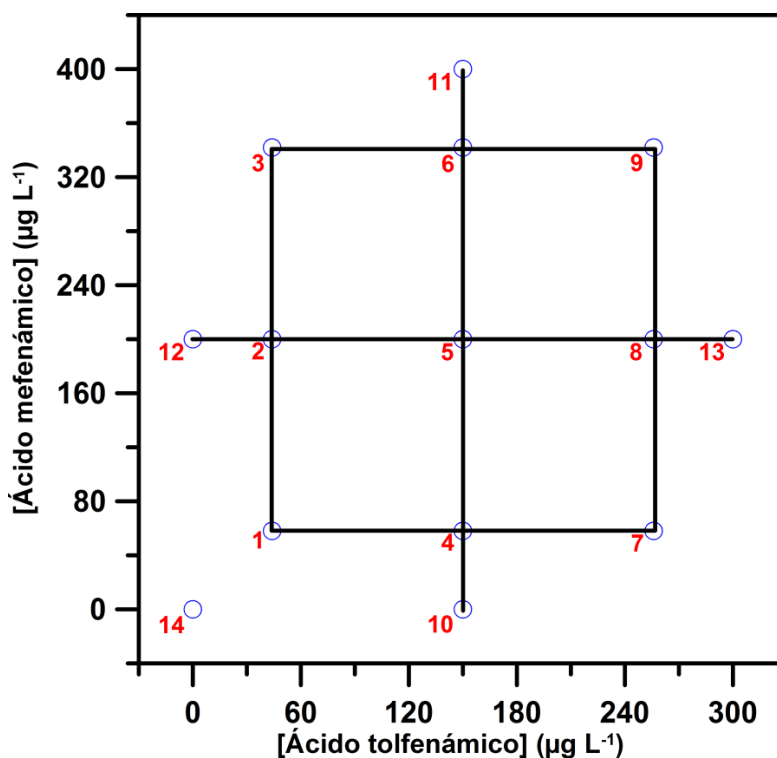


Figura B.15. Representación gráfica del esquema utilizado en la matriz de calibración.

Tabla B.7. Concentraciones de los analitos en cada punto de la matriz de calibración.

Muestra	[Ácido mefenámico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ácido tolfenámico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	58,0	44,0
2	200,0	44,0
3	342,0	44,0
4	58,0	150,0
5	200,0	150,0
6	342,0	150,0
7	58,0	256,0
8	200,0	256,0
9	342,0	256,0
10	0	150,0
11	400,0	150,0
12	200,0	0
13	200,0	300,0
14	0	0

En la figura B.16 pueden verse las catorce curvas de decaimiento, registradas en las condiciones químicas e instrumentales óptimas. Estas curvas se exportaron a archivos de texto y se utilizó el algoritmo PLS-1, el más ventajoso [274] de la subrutina MVC-1 de Matlab [252] para desarrollar el mejor modelo de calibración posible. Concretamente, se estudió el número de factores, los intervalos temporales a introducir y la posible presencia de puntos discrepantes. En este caso se utilizaron finalmente ocho blancos analíticos, a fin de mejorar los valores de los parámetros estadísticos del modelo de calibración multivariante.

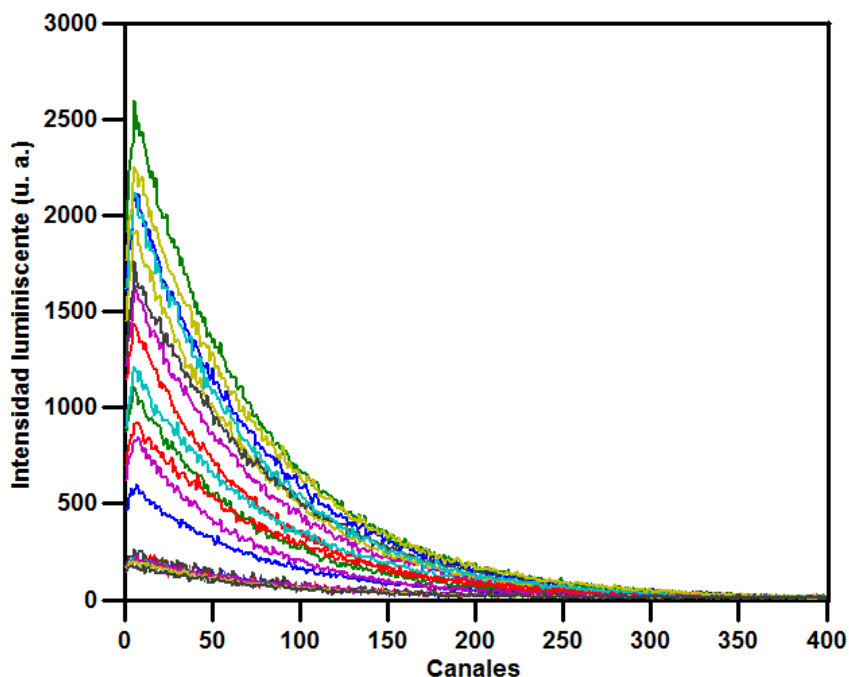


Figura B.16. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

Se utilizó el método de validaciones cruzadas para obtener el número óptimo de factores para cada analito. Inicialmente se introdujo en la subrutina de Matlab un valor de cuatro factores, previsiblemente mayor que el necesario. Siguiendo el criterio de Haaland y Thomas [238], que establece que el número óptimo de factores es aquél por el cual la probabilidad para la razón F (P) es igual o menor que 0,75, se obtuvo dos factores para ambos componentes, tal y como era de esperar de una mezcla binaria.

Como ya se explicó, en ocasiones no resulta ventajoso trabajar con las curvas de decaimiento completas, puesto que los resultados obtenidos pueden verse influenciados negativamente por zonas que no contengan información relevante acerca de los analitos en estudio. Debido a ello, se ensayaron diversos intervalos de las curvas de decaimiento introducidas y se obtuvieron los mejores resultados estadísticos (R^2 más cercano a la unidad y errores SEP y REP lo más bajos posible) cuando se analizó el intervalo de puntos comprendido entre el canal 5 y el 395, tanto para el complejo AM-Tb como para el complejo AF-Tb.

El hecho de que la razón F fuera en todos los casos inferior a la unidad implica que puede considerarse que no existe ningún punto discrepante en la matriz de calibración [238].

Las tablas B.8 y B.9 recogen los resultados estadísticos de la etapa de la calibración.

Tabla B.8. Optimización del número de factores (canales: del 5 al 395).

Número de factores	Ácido mefenámico			Ácido tolfenámico		
	PRESS	F	p	PRESS	F	P
0	439980	117,5	0,999	246790	346,7	0,999
1	169630	45,3	0,999	43019	60,4	0,999
2	3744,4	1	0,499	833,04	1,2	0,639
3	403,73	0	0	80,973	1,1	0,614
4	430,06	0	0	71,181	1	0,499

Tabla B.9. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R ²
Ácido mefenámico	2	13	10	0,990
Ácido tolfenámico	2	6,3	6,8	0,996

B.5.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)

Se prepararon diez muestras con concentraciones de ambos analitos comprendidas dentro de los intervalos de calibración y repartidas al azar dentro de los mismos, gracias al uso del programa de generación de números aleatorios [253]. Las

diez curvas de validación, obtenidas en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, pueden verse en la figura B.17.

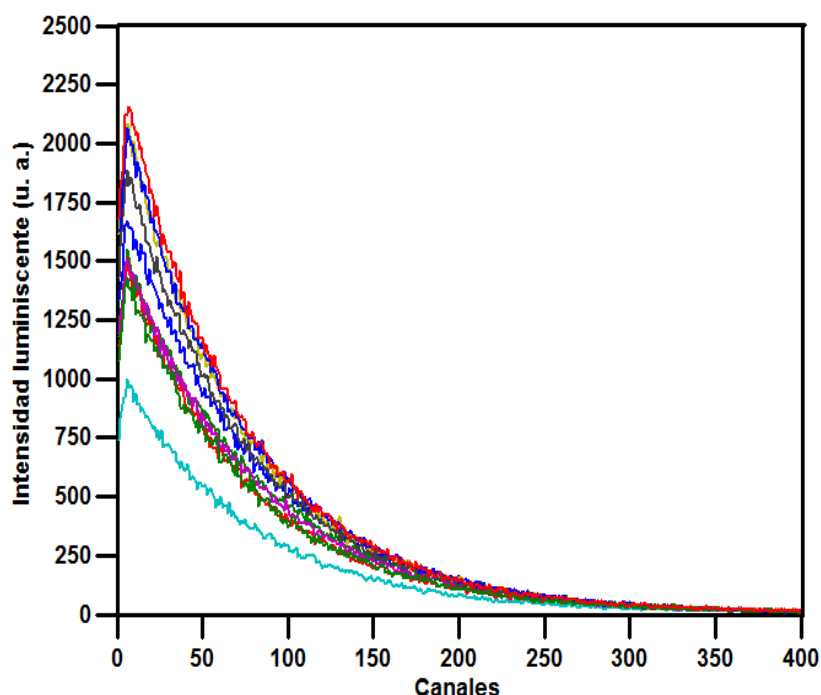


Figura B.17. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

Se utilizó la matriz de calibración desarrollada previamente para validar el método mediante el cálculo del contenido en fenamatos de cada una de las muestras de predicción. Se obtuvieron los resultados que se hallan recogidos en las tablas B.10 y B.11. Puede observarse que en todos los casos el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra próximo al 100 %. Además, se obtuvo una tendencia marcadamente lineal cuando se representaron las concentraciones de los analitos que el modelo PLS-1 predice frente a las concentraciones añadidas, tal y como refleja la figura B.18. Por último, las diferencias entre los valores teóricos y experimentales de la pendiente y la ordenada en el origen no son estadísticamente significativas, puesto que el punto (1,0) se encuentra dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen a un nivel de confianza del 95% [275] (véase la figura B.19).

Tabla B.10. Predicción del contenido en ácido mefenámico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	72,0	74,0	7,6	3,0	102,8
2	54,0	48,9	6,9	2,9	90,6
3	172,0	177,5	5,0	2,8	103,2
4	80,0	81,9	4,3	3,2	102,3
5	110,0	107,3	5,4	2,6	97,5
6	320,0	317,1	6,6	2,6	99,1
7	236,0	243,8	5,7	2,6	103,3
8	260,0	256,1	6,0	2,2	98,5
9	144,0	135,0	5,4	2,9	93,7
10	353,0	355,9	6,9	2,5	100,8

Tabla B.11. Predicción del contenido en ácido tolfenámico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	248,0	251,8	3,8	3,0	101,5
2	230,0	228,1	3,5	2,9	99,2
3	140,0	145,5	2,5	2,8	103,9
4	108,0	104,8	2,2	3,2	97,0
5	194,0	194,4	2,7	2,6	100,2
6	188,0	183,0	3,3	2,6	97,3
7	195,0	190,0	2,9	2,6	97,5
8	220,0	215,9	3,0	2,2	98,1
9	160,0	160,2	2,7	2,9	100,1
10	184,0	184,2	3,4	2,5	100,1

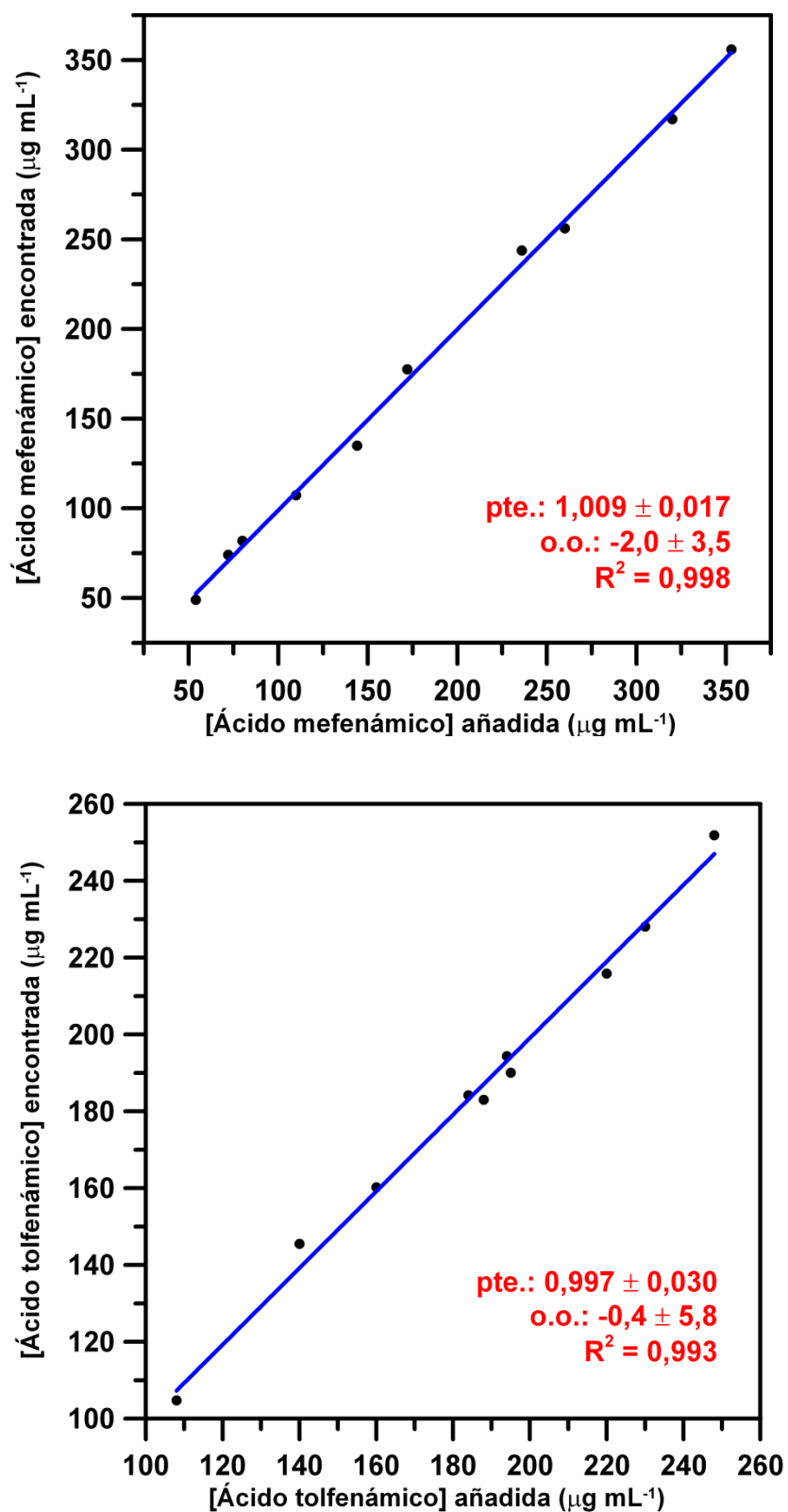


Figura B.18. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido tolfenámico(abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

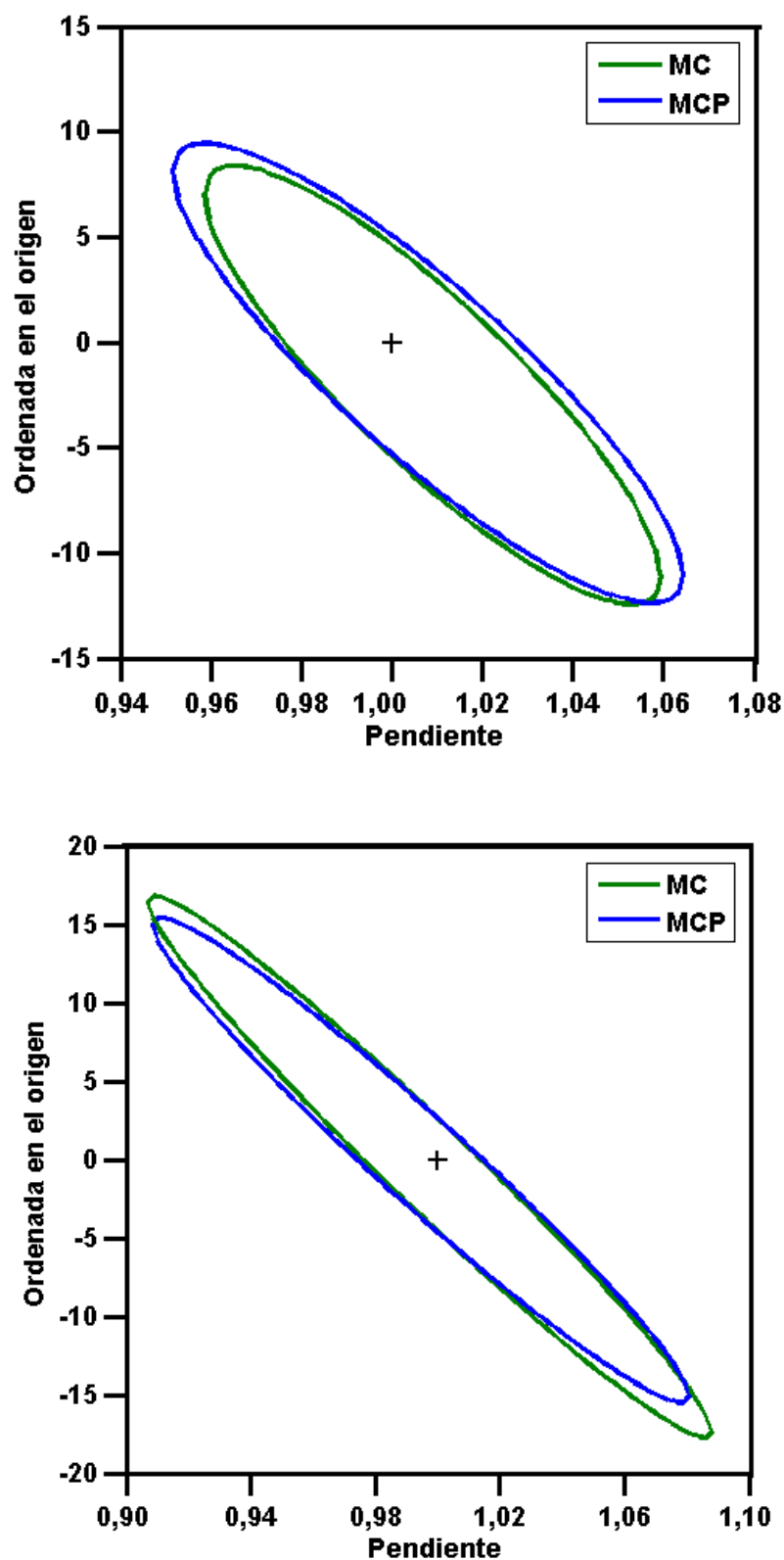


Figura B.19. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para el ácido mefenámico (arriba) y el ácido tolfenámico (abajo), considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (en verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (en azul).

B.6. Cálculo de los límites de detección

También en esta ocasión se calcularon los límites de detección siguiendo el criterio desarrollado por nuestro grupo de investigación [224, 276], el cual se basa en las recomendaciones de la IUPAC [240]. Recuérdese que en el cálculo de los límites de detección considera un factor de seguridad de tres, la desviación estándar de diez replicados del blanco analítico y la pendiente de la recta que relaciona las concentraciones de analito añadidas y las encontradas mediante la metodología de calibración multivariante. La tabla B.12 recoge los valores obtenidos para todos estos parámetros. Los valores calculados para los límites de detección son los esperados en la determinación de fenamatos mediante métodos basados en luminiscencia sensibilizada por terbio [40].

<i>Tabla B.12. Cálculo de los límites de detección (LD).</i>			
Analito	S_b (µg L⁻¹)	b	LD (µg L⁻¹)
Ácido mefenámico	5,4	1,0	15,9
Ácido tolfenámico	5,0	1,0	14,9

B.7. Estudio de la precisión del método

La precisión del método propuesto se evaluó mediante la preparación, el registro y la predicción de una serie de diez replicados de una disolución que contenía 290,0 µg L⁻¹ de ácido mefenámico y 160,0 µg L⁻¹ de ácido tolfenámico, tal y como muestra la tabla B.13. Las concentraciones medias estimadas fueron $289,4 \pm 3,0$ y $159,9 \pm 2,6$ para los ácidos mefenámico y tolfenámico, respectivamente, lo cual indica la alta precisión del método propuesto.

Tabla B.13. Predicción de diez replicados de una muestra que contenía $290,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido mefenámico y $16,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido tolfenámico.

Muestra	[Ácido mefenámico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ácido tolfenámico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	288,2	161,3
2	293,5	159,2
3	293,1	156,5
4	285,3	164,0
5	293,3	157,8
6	289,4	159,2
7	289,2	157,9
8	286,2	158,6
9	286,4	160,0
10	288,9	164,4
Valor medio	$289,4 \pm 3,0$	$159,9 \pm 2,6$

B.8. Estudio de la selectividad del método

Con la finalidad de estudiar la selectividad del método desarrollado, se registraron y predijeron muestras sintéticas que contenían $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ambos fenamatos en estudio y cantidades variables de posibles interferentes pertenecientes a la familia de los AINEs. Se comenzó siempre con la proporción 1/1 y se aumentó o disminuyó en función de la aparición de interferencias. En la figura B.20 pueden observarse los resultados en forma de diagrama de barras. Se consideró que el compuesto adicional constituía una interferencia cuando el porcentaje de recuperación superaban un $\pm 5\%$ de error.

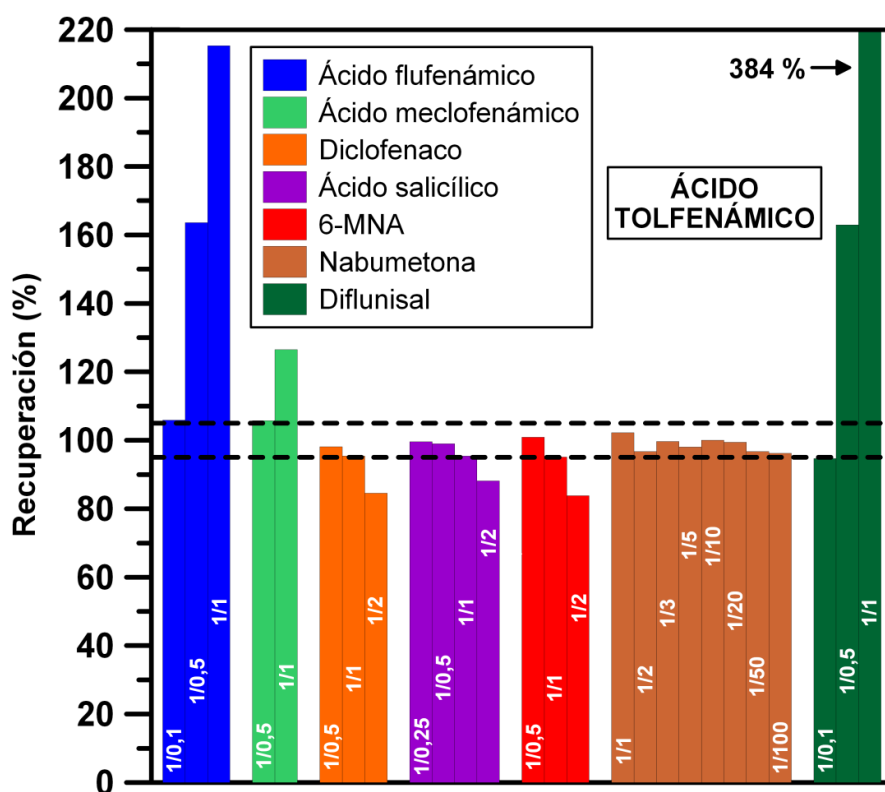
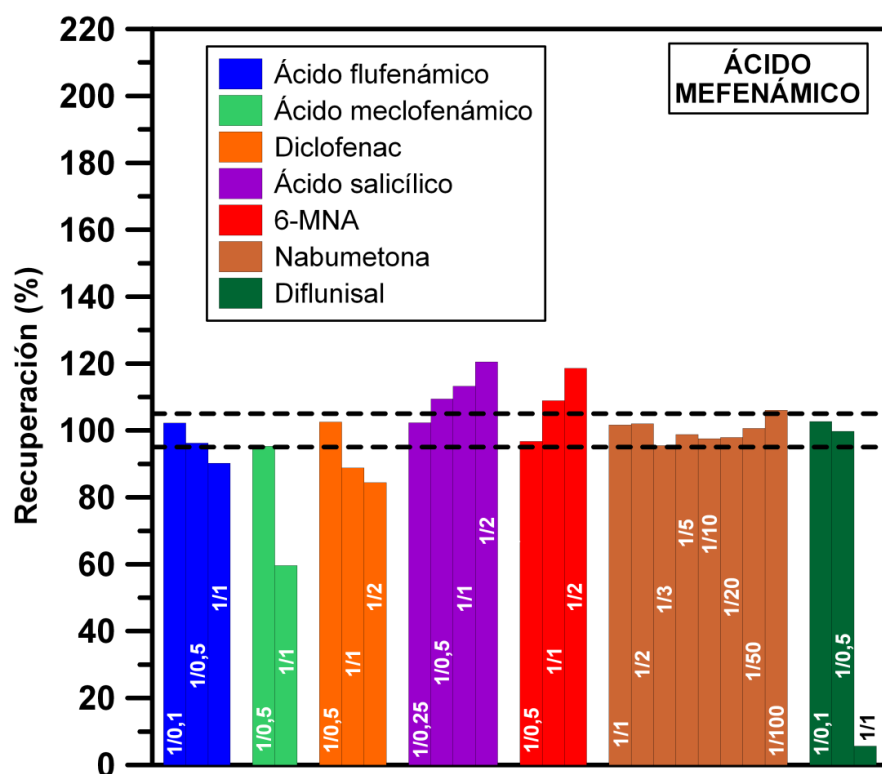


Figura B.20. Diagramas de barras para el estudio de interferencias en la determinación conjunta de ácido mefenámico (arriba) y de ácido tolfenámico (abajo).

Los ácidos flufenámico y meclofenámico dan lugar a interferencias muy importantes. Esto era de esperar puesto que, al igual que los analitos en estudio, pertenecen a la familia de los fenamatos.

Aunque la nabumetona apenas interfiere, incluso a proporciones muy elevadas, sí lo hace su metabolito activo, el ácido 6-metoxi-2-naftilacético (6-MNA). Por su parte, el diclofenaco y el ácido salicílico dan lugar a señales de fondo que interfiere en la determinación de ambos analitos, pero ligeramente más con el ácido mefenámico (el tiempo de vida del ácido salicílico en estas condiciones es de aproximadamente 1200 μ s, más cercano al del ácido mefenámico que al del ácido tolfenámico).

La presencia de diflunisal afecta enormemente a la determinación de ácido tolfenámico. Este hecho se debe a que el diflunisal da lugar a una señal extremadamente intensa, cuyo tiempo de vida es aproximadamente 1890 μ s, es decir, muy cercano al tiempo de vida del ácido tolfenámico. Esta interferencia no afecta, en principio a la determinación de ácido mefenámico, ya que su tiempo de vida es mucho menor. Sin embargo, a una proporción 1/1, la interferencia debida a la presencia de diflunisal con el ácido tolfenámico es ya tan grande que los valores de concentración predichos para este último prácticamente duplican los valores máximos de la matriz de calibración y, en consecuencia, la predicción de ácido mefenámico se ve enormemente afectada.

El algoritmo de Marquardt [247] se utilizó en el cálculo de todos los tiempos de vida a los que se hace referencia en este apartado.

B.9. Aplicaciones del método propuesto

B.9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas

Puesto que no se encontraron medicamentos que contuvieran en su composición ácido tolfenámico, únicamente se analizó el fármaco Coslan, del cual ya se comentaron

su composición y las operaciones efectuadas para preparar la disolución de partida para las medidas.

Se prepararon tres series diferentes, cada una de ellas constituidas por tres replicados de muestras sintéticas que contenían el fármaco: la muestra 1 en ausencia de ácido tolfenámico, la muestra 2 en presencia de una concentración baja de éste, y la muestra 3 en presencia de una concentración mayor. Las disoluciones resultantes se midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas y se predijo las concentraciones de los analitos en cada muestra mediante PLS. Los resultados, expresados como porcentaje de recuperación medio de los tres replicados de cada muestra analizados, se recogen en la tabla B.14.

Tabla B.14. Resultados del análisis de muestras sintéticas de Coslan que contenían además diversas concentraciones de ácido tolfenámico.

Muestra	[Analito] nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)	
	AM	AT	AM	AT	AM	AT	AM	AT
1	300,0	-	-	0	293,6	-	97,8	-
2	200,0	-	-	60,0	203,3	61,5	101,6	102,4
3	200,0	-	-	130,0	207,3	128,0	103,6	98,4

Las concentraciones de ácido mefenámico calculadas concuerdan totalmente con el contenido nominal de la preparación farmacéutica, puesto que los porcentajes de recuperación obtenidos en el análisis de las disoluciones de Coslan son en todos los casos próximos al 100%. Además, el principio activo de esta medicina puede determinarse sin problemas en presencia de ácido tolfenámico.

B.9.2. Aplicación del método a muestras de orina humana

Al igual que en la determinación simultánea de ácido flufenámico y ácido mefenámico, el desarrollo de un método de calibración multivariante que incluyera la influencia de la orina originó un modelo con capacidad de predicción muy pobre. Como a las longitudes de onda usadas en este trabajo la orina no presenta fluorescencia nativa [277], estos resultados se deben únicamente al intenso efecto matriz al cual da lugar la orina. Para solventarlo se abordó la misma estrategia utilizada en la determinación de la otra mezcla binaria de fenamatos en orina: se tomaron a primera hora de la mañana muestras de orina de tres personas sanas a las que no se había administrado ningún tipo de medicamento, se centrifugaron durante quince minutos, y se diluyeron 100 veces con agua destilada. A continuación, se prepararon tres series de cinco muestras sintéticas que contenían diferentes concentraciones de los ácidos tolfenámico y mefenámico, así como una dilución 1:250 de una de las orinas recogidas. Dichas series de muestras se analizaron en las condiciones químicas e instrumentales optimizadas y se predijeron utilizando el modelo PLS desarrollado, obteniéndose los resultados recogidos en la tabla B.15. Además, se hizo uso del método de mínimos cuadrados para ajustar los datos a líneas rectas mediante (véase la figura B.21).

Tabla B.15. Resultados del análisis de muestras sintéticas de orina que contenían ácido mefenámico y ácido tolfenámico.

Muestra	[Analito] ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	Añadida		Predicha en orina 1		Predicha en orina 2		Predicha en orina 3	
	AM	AT	AM	AT	AM	AT	AM	AT
1	200,0	98,0	139,1	46,0	140,1	42,4	139,5	42,8
2	300,0	140,0	195,4	60,8	195,0	63,6	194,1	59,1
3	100,0	196,0	88,6	80,9	89,2	79,5	83,1	83,6
4	156,0	250,0	122,9	98,0	114,5	101,1	120,2	99,1
5	60,0	300,0	73,1	124,9	73,1	121,2	72,9	119,9

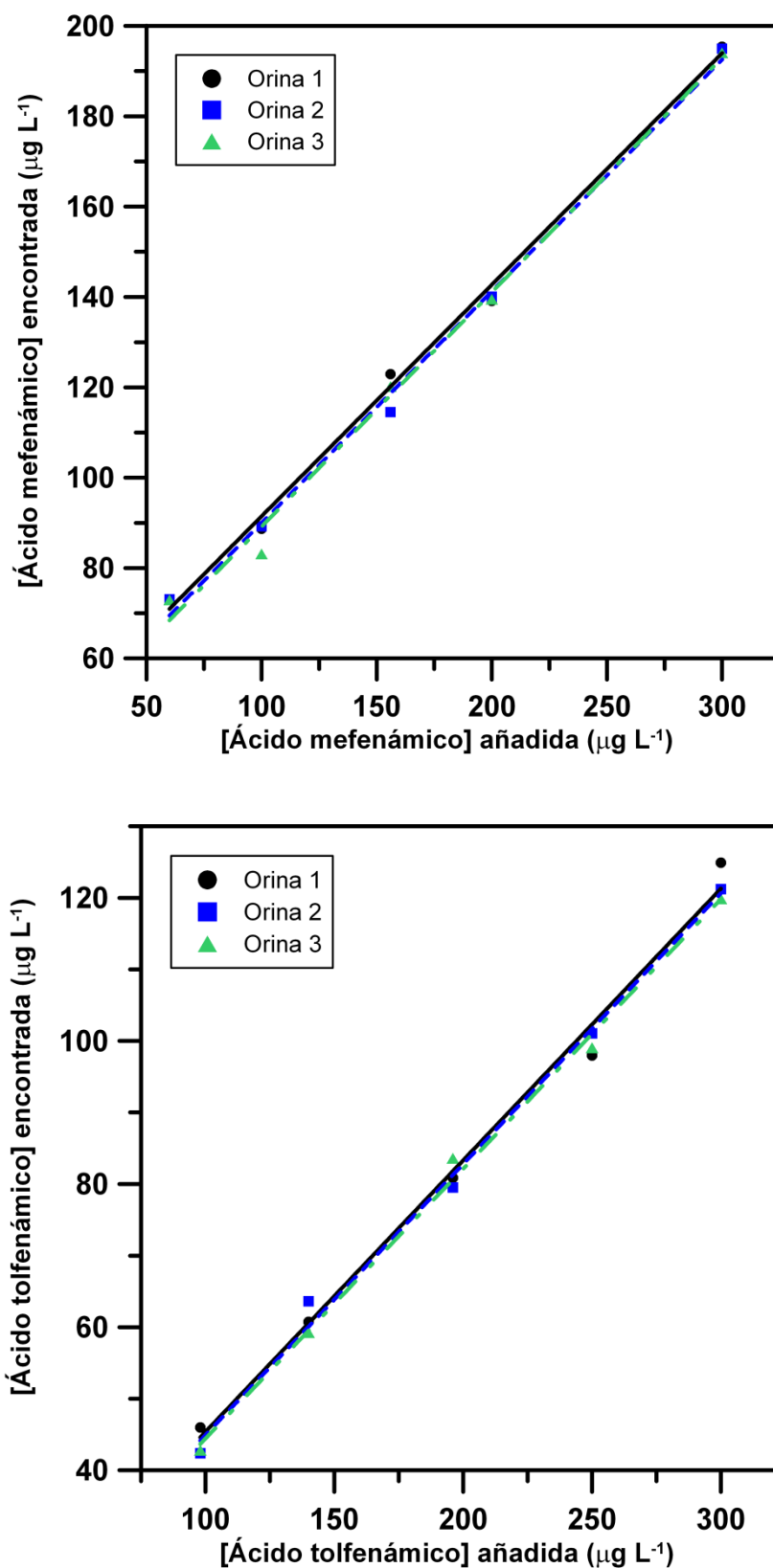


Figura B.21. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido tolfenámico(abajo) en tres muestras diferentes de orina.

Las rectas de calibración globales, obtenidas también mediante mínimos cuadrados, aparecen representadas en la figura B.22.

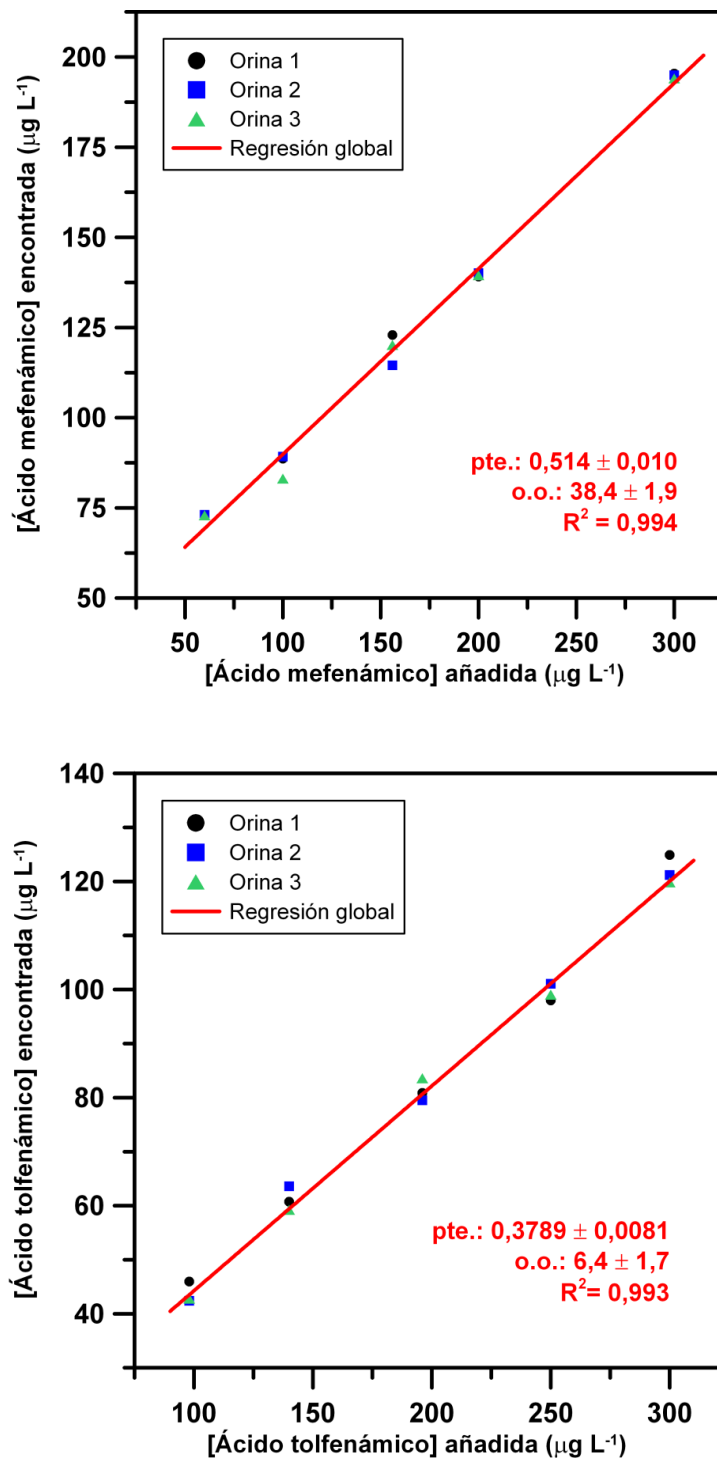


Figura B.22. Rectas globales de calibración para el ácido mefenámico (arriba) y para el ácido tolfenámico(abajo) obtenidas mediante mínimos cuadrados.

Por último, se llevó a cabo un análisis de varianza para constatar la viabilidad de las rectas de regresión globales, así como si existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres series de datos, se. En la tabla B.16 pueden verse los valores teóricos para los estadísticos F' y F'' , así como los valores obtenidos experimentalmente.

<i>Tabla B.16. Valores de los estadísticos F' y F'' usados en el análisis de varianza.</i>		
	F'	F''
Valor teórico (95% confianza)	3,63	4,26
Ácido mefenámico	0,198	0,0867
Ácido tolfenámico	0,0788	0,0106

Los resultados del análisis de varianza demuestra que las rectas globales pueden usarse en la predicción de las concentraciones de ácido tolfenámico y de ácido mefenámico en orina, ya que, en todos los casos, los valores experimentales son menores que los valores teóricos y, por tanto, se cumplen las dos hipótesis del método estadístico.

CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE NABUMETONA Y SU PRINCIPAL METABOLITO POR FLUORESCENCIA RESUELTA EN EL TIEMPO

Abstract

A fluorescent method for the simultaneous determination of nabumetone and its main metabolite, 6-methoxy-2-naphtylacetic acid (6-MNA), in pharmaceutical preparations and human urine is proposed in this chapter. Due to the strong overlapping between the fluorescence spectra of both analytes, the use of fluorescence decay curves to resolve their mixture is proposed, since these curves are more selective. Values of dependent instrumental variables affecting the signal-to-noise ratio were fixed using a simplex optimization procedure. A factorial design with two levels per factor coupled to a central composite design was selected to obtain a calibration matrix of thirteen standards plus one blank sample that was processed using a partial least-squares (PLS) analysis. In order to assess the goodness of the proposed method, a prediction set of ten synthetic samples was analyzed, obtaining recuperation percentages between 97 and 105 %. Limits of detection, calculated by means of a new criterion, were 0.96 and 0.88 $\mu\text{g L}^{-1}$ for nabumetone and 6-MNA, respectively. The method was also tested in the pharmaceutical preparation Relif, which contains nabumetone, obtaining recovery percentages close to 100%. Finally, the simultaneous determination of both analytes in human urine samples was successfully carried out by the PLS-analysis of a matrix of fifteen standards plus four analyte blanks, and the use of the standard addition technique. Although urine shows native fluorescence, no extraction method neither prior separation of the analytes were needed.

1. Generalidades

La nabumetona, o 4-(6-metoxi-2-naftalenil)-2-butanona, pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Se trata de un profármaco que requiere de una biotransformación a un metabolito activo, el ácido 6-metoxi-2-naftilacético (6-MNA), el cual posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. La nabumetona da lugar a menores reacciones adversas gastrointestinales en comparación con otros AINEs.

La administración de nabumetona está indicada para el tratamiento de procesos antiinflamatorios, como la osteoartritis y la artritis reumatoide, y de las molestias perarticulares. Su mecanismo de acción implica la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (especialmente la COX-2) por parte del 6-MNA.

Los fármacos que contienen nabumetona se administran por vía oral y son bien absorbidos por el tracto digestivo. Mediante metabolismo hepático, aproximadamente el 35% de la nabumetona se biotransforma en 6-MNA y otros metabolitos minoritarios. La eliminación de la nabumetona y de sus metabolitos tiene lugar mayoritariamente en orina.

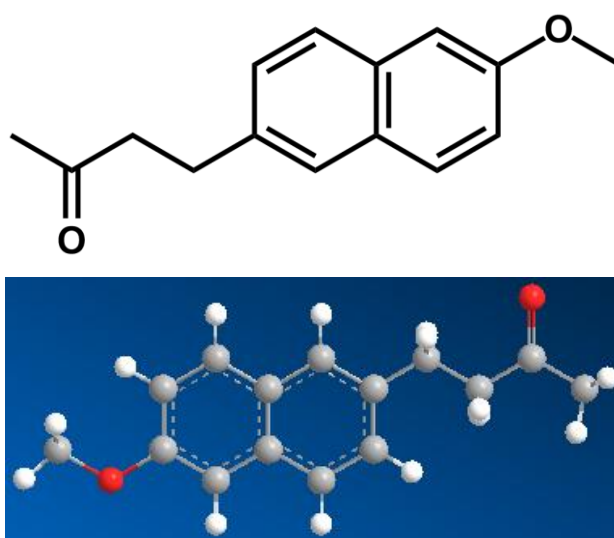


Figura 1. Estructura química en dos y tres dimensiones de la nabumetona.

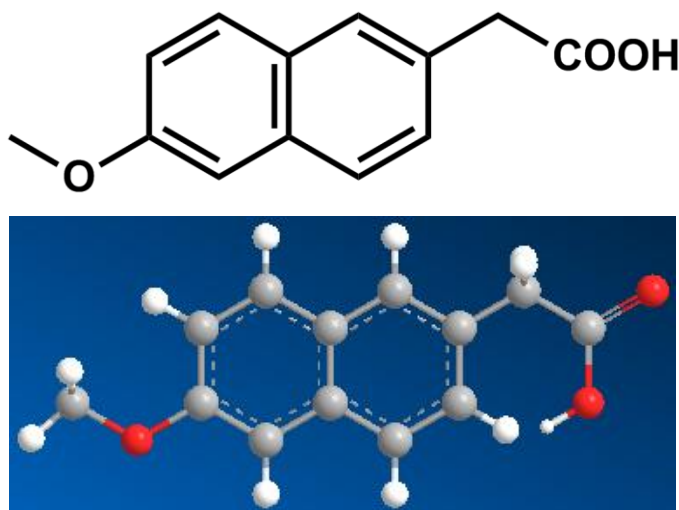


Figura 2. Estructura química en dos y tres dimensiones del 6-MNA.

En bibliografía pueden encontrarse gran cantidad de métodos para determinar nabumetona o 6-MNA, e incluso ambos compuestos simultáneamente, si bien hasta la fecha no existe ningún método que no requiera una separación previa de los analitos.

- Para determinar nabumetona en fármacos se han descrito **métodos espectrofotométricos** basados en la medida de la absorbancia, bien directamente [331, 332], bien tras una derivatización a compuestos coloreados [333, 334]. Más recientemente, Can y col. desarrollaron un método para determinar nabumetona en fármacos mediante análisis por inyección en flujo y detección UV [335]. No se observaron interferencias por parte de los excipientes y el límite de detección calculado fue $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$.
- Ma y col. [336] describieron en 2006 un **método polarográfico** catalizado por KIO_3 para la determinación de nabumetona en fármacos, sin necesidad de separación previa de sus excipientes. El límite de detección fue de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.
- Se utilizaron **métodos voltamperométricos** en el año 2007 [337] para determinar nabumetona en suero y orina, con límites de detección comprendidos entre $2,31 \cdot 10^{-7}$ y $2,51 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

- En 2005, nuestro grupo de investigación propuso dos **métodos fosforescentes** para la determinación de 6-MNA. El primero de ellos [338] hace uso de la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomo pesado. El método lleva asociado un límite de detección de $24,7 \text{ ng mL}^{-1}$ y se aplicó satisfactoriamente a orina y plasma humanos sin necesidad de extracción previa. El segundo [339] determina 6-MNA en orina mediante la técnica de flujo detenido y fosforescencia micelar a temperatura ambiente. La optimización de variables se llevó a cabo por el método simplex y se obtuvo un límite de detección de $24,7 \text{ ng mL}^{-1}$. Este último procedimiento se utilizó asimismo para la determinación de nabumetona en preparaciones farmacéuticas [340], obteniéndose un límite de detección de $21,3 \text{ ng mL}^{-1}$.
- La **cromatografía de gases** se ha usado también para determinar nabumetona en preparaciones farmacéuticas [341], obteniéndose recuperaciones del 99,9%.
- La mayor parte de los métodos están basados, sin embargo, en la **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**, tal y como informan Starek y Krzek en un trabajo de revisión del año 2009 [342].

Dos trabajos describen la determinación de nabumetona y de 6-MNA en suero mediante HPLC, previa extracción con n-hexano/acetato de etilo, evaporación a sequedad y redisolución en acetonitrilo. En el primero de ellos [343], de 1984, los límites de detección son $0,25$ y $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, para nabumetona y 6-MNA, respectivamente. En el segundo [344], de 7 y 5 ng. Este último método, publicado en 1997, se aplicó también a la determinación de nabumetona en fármacos.

Sane y col. [345] aplicaron en 1993 tres técnicas diferentes (espectrofotometría y cromatografías gaseosa y líquida) a la cuantificación de nabumetona en preparaciones farmacéuticas, obteniendo en todos los casos recuperaciones próximas al 100%.

HPLC con detección UV se ha utilizado también para determinar nabumetona [346] en fármacos [347, 348], con excelentes recuperaciones en todos los casos.

El uso de una columna Pinkerton en HPLC permitió a Haque y Stewart [349] determinar nabumetona de entre una mezcla de AINES, con un límite de detección de 700 ng mL^{-1} , mientras que Cheng y col. [350] utilizaron columnas híbridas Xterra para determinar 37 compuestos de interés farmacológico (entre ellos, nabumetona). Hicieron uso de fases móviles a distintos pH para obtener una mayor selectividad.

En 2000, Mikami y col. [351] determinaron naproxeno, nabumetona y 6-MNA mediante HPLC en fase inversa en fármacos (con detección UV) y orina (previa extracción en fase sólida y con detección fluorimétrica). Los límites de detección fueron 0,3 ng para naproxeno, 1,5 ng para nabumetona y 0,2 ng para el 6-MNA.

El método propuesto por de Jager y col. [352] para determinar 6-MNA en suero destaca con respecto a otros métodos similares [353-355], ya que, a diferencia de estos últimos, no requiere una extracción previa, por lo que es muy adecuado para estudios farmacológicos. El límite de cuantificación fue de 70 ng mL^{-1} .

Escuder Gilabert y col. [356] determinaron nabumetona en fármacos mediante cromatografía líquida micelar, con límites de detección comprendidos entre 0,01 y $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, y recuperaciones entre el 95 y el 108%.

En 2003, Kobylinska y col. [357] determinaron nabumetona en plasma humano mediante HPLC con detección fluorimétrica, previa extracción líquido-líquido con acetato de etilo. El límite de cuantificación se estableció en $0,31 \text{ ng mL}^{-1}$.

En ese mismo año, Nobilis y col. [358] llevaron a cabo un exhaustivo estudio de la biotransformación de la nabumetona en humanos y cerdos, utilizando HPLC con detecciones UV, fluorescente y MS. Estudiaron muestras de orina, líquido sinovial y bilis, y obtuvieron límites de detección para la nabumetona y sus

metabolitos en el rango de nmol mL^{-1} . Estos autores confirmaron, por ejemplo, que el metabolito de la nabumetona que aparece mayoritariamente en la orina humana es el 6-MNA. Completaron su estudio un año más tarde [359] determinando por HPLC y detecciones fluorescente y MS los metabolitos de fase II de la nabumetona (ésteres glucorónidos).

También en 2004, Sheen y col. [360] determinaron simultáneamente nabumetona y testosterona en plasma humano mediante derivatización con pentafluorofenil hidracina y posterior análisis mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas. Si bien los límites de detección son muy bajos ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$), el método en cuestión resulta ser demasiado laborioso como para poder ser aplicado a análisis rutinarios.

Rao y col. [361] desarrollaron en 2005 un método de HPLC con detección fluorescente para la determinación simultánea de varios inhibidores de COX-2 (entre ellos, la nabumetona). Obtuvieron límites de detección comprendidos entre $0,127$ y $1,040 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. El método se aplicó satisfactoriamente a muestras farmacológicas y de orina.

Muy meritorio resulta el trabajo publicado por Stanley y Foo en 2006 [362]. Se trata de un método de “screening” basado en HPLC-MS/MS para determinar más de 250 principios activos diferentes (entre ellos, nabumetona) en orina equina, con límites de detección comprendidos entre $0,1$ y 10 ng mL^{-1} .

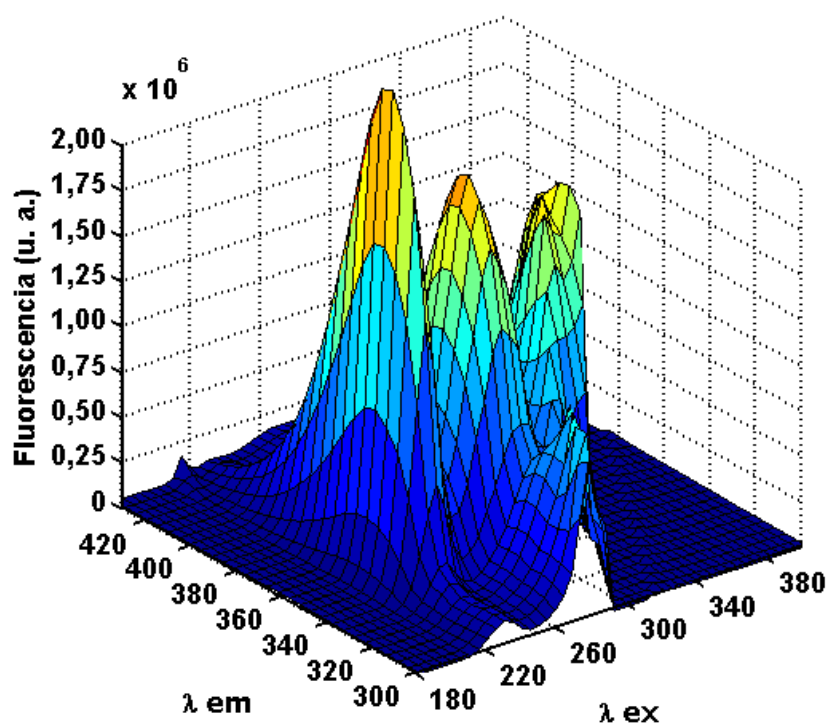
En el año 2008, Patel y col. [363] determinaron 6-MNA en plasma humano mediante HPLC-MS/MS, previa extracción en fase sólida y utilizando propranolol como patrón interno. El límite de cuantificación fue de $0,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, suficiente para poder determinar el analito en plasma con gran precisión y reproducibilidad.

Por último, Nespěšná y col. [364] desarrollaron en 2011 un método para determinar nabumetona y 6-MNA en plasma humano basado en una extracción en fase sólida previa a HPLC. Los porcentajes de recuperación variaron entre el

84 y el 90%, y los límites de detección calculados fueron 50 nmol L^{-1} y $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para 6-MNA y nabumetona, respectivamente, con detección UV; y $1,0$ y $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para 6-MNA y nabumetona, respectivamente, utilizando detección MS.

2. Características espectrales de los analitos y estudio de sus curvas de decaimiento

Las figuras 3 y 4 muestran los espectros de fluorescencia total tanto de nabumetona como de 6-MNA ($100,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de analito; pH 8,0; 80% v/v EtOH). Como puede verse, ambos analitos poseen bandas anchas de excitación, con cuatro máximos (a 234, 275, 321 y 334 nm), así como un máximo de emisión fluorescente a 353 nm. Asimismo, obsérvese el completo solapamiento que existe entre los espectros de los dos analitos, lo cual impide su determinación simultánea por métodos fluorimétricos clásicos.



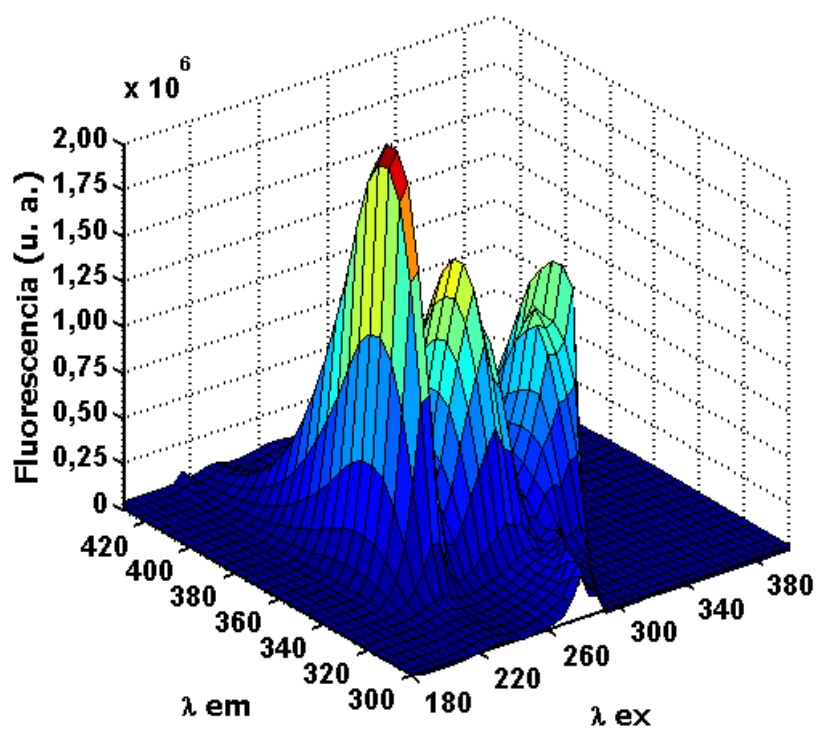


Figura 3. Espectros tridimensionales de fluorescencia de la nabumetona (arriba) y del 6-MNA (abajo).

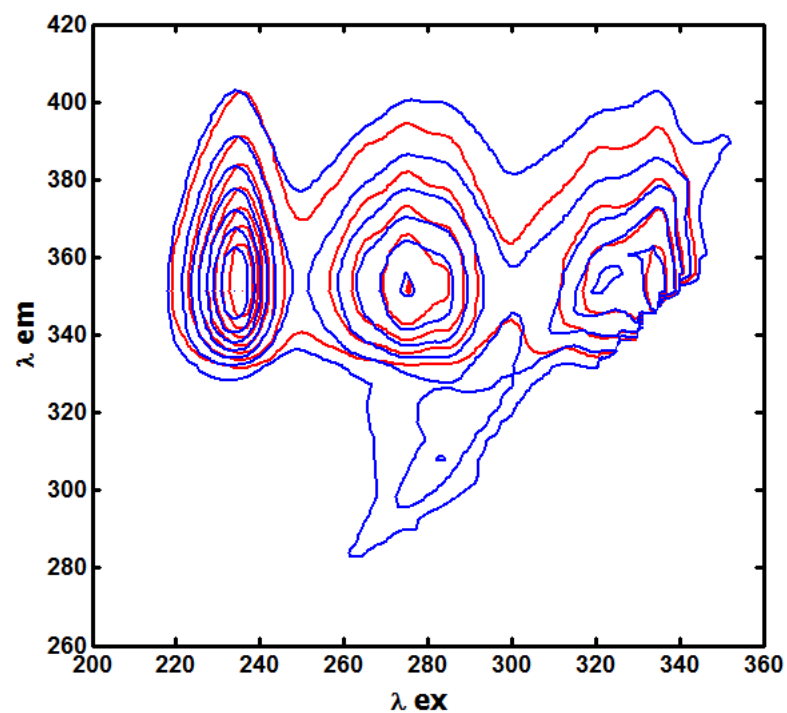


Figura 4. Curvas de nivel que muestran la fluorescencia total de la nabumetona (en rojo) y del 6-MNA (en azul).

Por otra parte, para registrar las curvas de decaimiento, la excitación de los analitos se llevó a cabo utilizando el láser de nitrógeno. Como longitud de onda de excitación se escogió 337 nm, que es el valor al cual emite radiación el láser. Las figuras 3 y 4 muestran que este valor de longitud de onda no se corresponde con ninguno de los máximos de excitación de los analitos (aunque se halla muy cerca del cuarto). Sin embargo, experimentalmente se comprobó que se obtenían señales mucho más intensas excitando a la longitud de onda nativa del láser que excitando a otra longitud de onda más cercana al máximo absoluto de fluorescencia de los analitos. Este hecho se debe a que el segundo caso implica la utilización de colorantes para modificar la longitud de onda de excitación de la fuente de radiación, lo cual lleva asociado una pérdida de intensidad de la misma muy importante.

Las curvas de decaimiento luminiscente de la nabumetona y el 6-MNA (100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de analito; pH 8,0; 80% v/v EtOH; $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 353 \text{ nm}$), así como la señal procedente de la fuente de excitación, pueden verse en la figura 5.

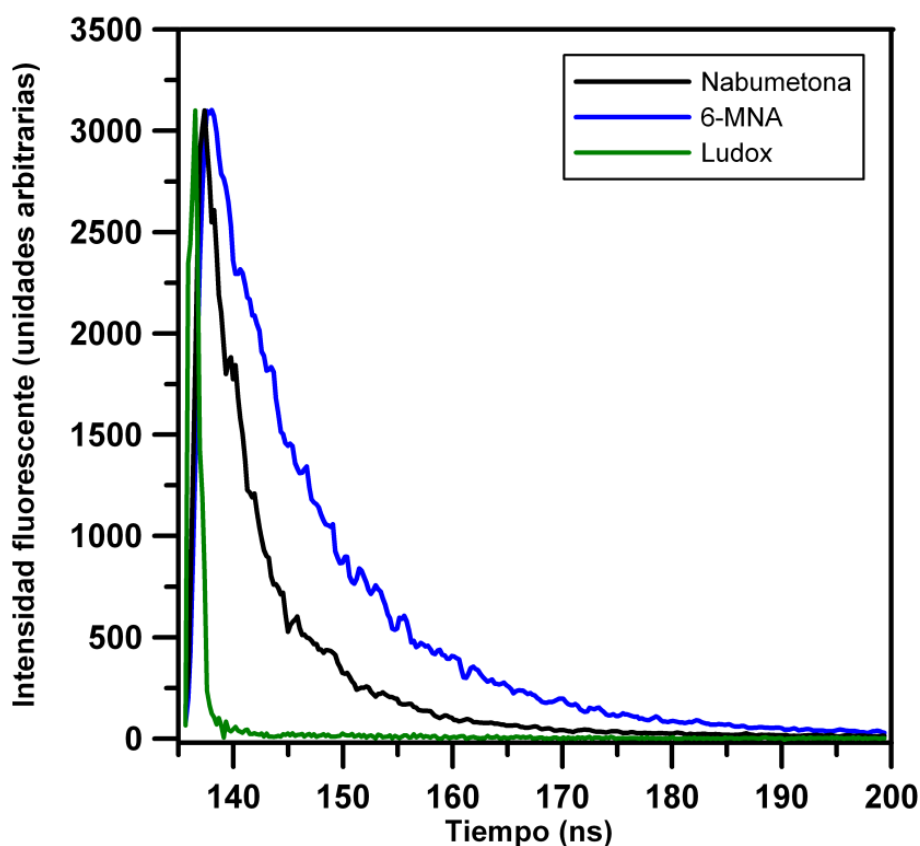


Figura 5. Curvas de decaimiento fluorescente normalizadas de la nabumetona (en negro), del 6-MNA (en azul) y de la disolución de ludox (en verde)

El análisis de estas curvas de decaimiento mediante el algoritmo de Marquardt [247], contenido en el software Felix32, dio lugar a las curvas de ajuste que pueden observarse en la figura 6, y a los tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad contenidos en la tabla 1.

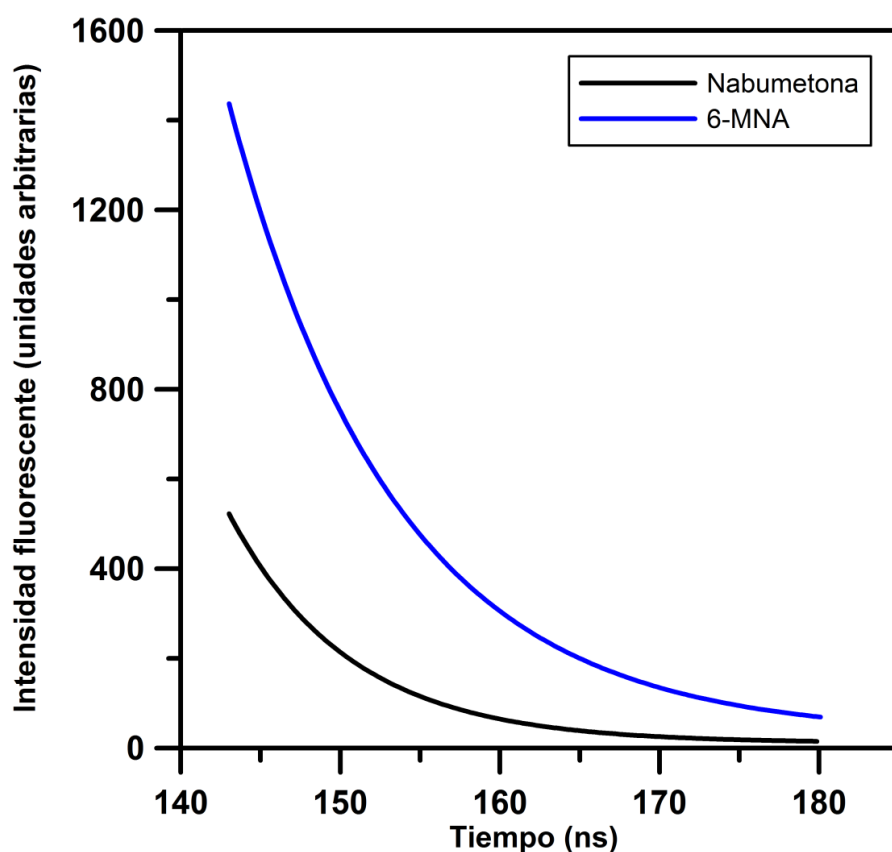


Figura 6. Ajustes obtenidos para las curvas de decaimiento de la nabumetona (negro) y del 6-MNA (azul).

Tabla 1. Tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad para la nabumetona y el 6-MNA.

Parámetro	Nabumetona	6-MNA
χ^2	1,04	0,96
DW	2,10	1,84
Preexponencial	2175 ± 60	3794 ± 16
Tiempo de vida (ns)	$7,532 \pm 0,091$	$10,443 \pm 0,024$

Los parámetros estadísticos de calidad indican que en ambos casos los ajustes son satisfactorios, ya que los valores del parámetro χ^2 se encuentran entre 0,8 y 1,3, y los del parámetro de Durbin-Watson (DW) son superiores a 1,7. La distribución tanto de la función de autocorrelación como de los residuales fue aleatoria alrededor de cero. Los tiempos de vida medios calculados son aproximadamente 7,5 ns para la nabumetona y 10,4 ns para el 6-MNA. Como se demostrará a continuación, esta pequeña diferencia entre las curvas de decaimiento de ambos analitos es suficiente para resolver con éxito mezclas entre ellos.

3. Estabilidad de las disoluciones

Se prepararon disoluciones madre de nabumetona y 6-MNA de 50,0 mg L⁻¹ disolviendo los analitos en etanol del 98%. Las disoluciones se conservaron a 4°C y en la oscuridad, y su estabilidad se estudió periódicamente durante un mes mediante la medida de la intensidad del pico de fluorescencia (λ_{exc} = 337 nm; λ_{em} = 353 nm), sin obtener variaciones apreciables. El mismo procedimiento mostró que las disoluciones de trabajo, preparadas a partir de las disoluciones madre, eran estables durante al menos una hora.

4. Optimización de variables

Se procedió a continuación a la optimización de todas las variables, tanto químicas como instrumentales, que influyen en el registro de las curvas de decaimiento luminiscente de la nabumetona y el 6-MNA. En todo este estudio se mantuvieron constantes las concentraciones de ambos analitos en un valor de 500,0 µg L⁻¹.

4.1. Optimización secuencial de variables químicas

4.1.1. Porcentaje de etanol

Experimentalmente se observó que la nabumetona apenas presenta fluorescencia en disolución acuosa. Sin embargo, es intensamente fluorescente en etanol. Por ello, se decidió utilizar etanol como disolvente y fue necesario estudiar en primer lugar cómo afecta su porcentaje en las disoluciones de trabajo a las propiedades fluorescentes de los analitos. La figura 7 muestra la variación de la máxima intensidad fluorescente con el porcentaje de etanol y confirma los estudios preliminares que apuntaban a que la fluorescencia de la nabumetona aumenta enormemente con el porcentaje de etanol. No obstante, este efecto no es tan acusado para el 6-MNA, cuya intensidad de fluorescencia comienza incluso a decaer por encima del 70% v/v de etanol.

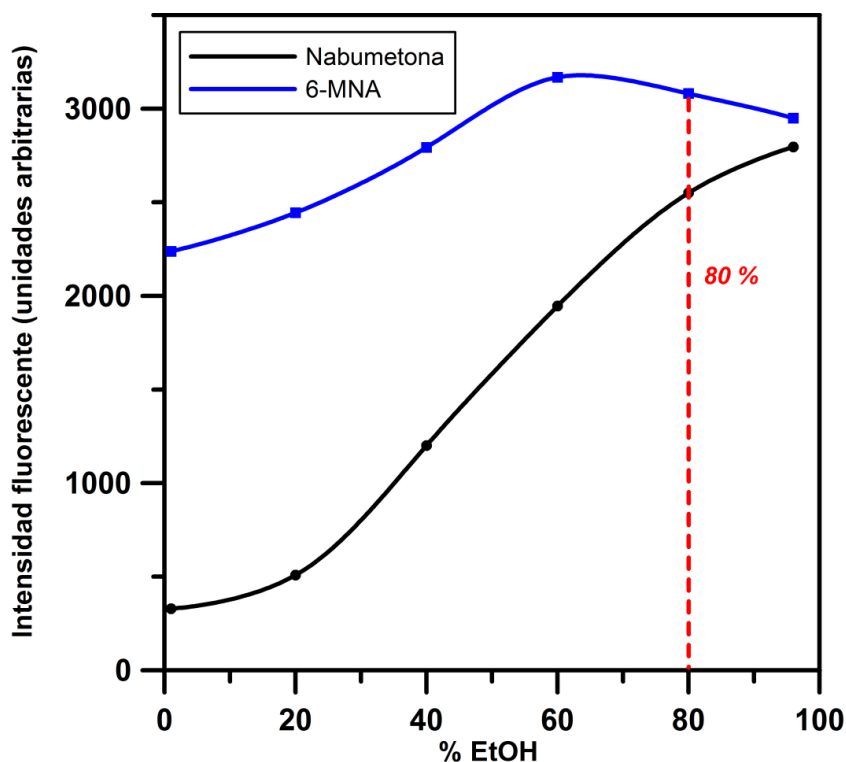


Figura 7. Influencia del porcentaje de etanol en la fluorescencia de la nabumetona y del 6-MNA.

Por otra parte, no se encontraron variaciones significativas entre los tiempos de vida calculados en los diferentes casos para el 6-MNA ni para la nabumetona, si bien en este último caso los tiempos de vida fueron los esperados sólo a partir del 40% v/v de etanol, ya que por debajo de este porcentaje la intensidad de las curvas era demasiado baja como para garantizar cálculos fiables.

Se decidió elegir para experiencias posteriores un porcentaje de etanol del 80 % v/v, a fin de que hubiera aún margen para incluir disoluciones acuosas en la composición de las muestras a analizar (esencial para la ulterior aplicación del método a muestras de orina).

4.1.2. Selección del pH óptimo y de la naturaleza y concentración del tampón

La influencia del pH se estudió en el intervalo comprendido entre 2,0 y 11,0 mediante adiciones de cantidades adecuadas de HCl o NaOH hasta obtener el pH deseado en cada caso. Puede apreciarse en la figura 8 que, en este caso, variaciones en el pH no afectan significativamente la fluorescencia de la nabumetona, y sólo ligeramente la del 6-MNA. El pH no produce variaciones en el tiempo de vida de ninguno de los dos analitos. Se eligió como pH óptimo un valor de 8,0, ya que la fluorescencia del 6-MNA se ve más favorecida a pH ligeramente básico.

Para mantener constante dicho pH se ensayó con éxito el tampón Tris ($pK_a = 8,06$), cuya concentración no modifica significativamente ni la intensidad fluorescente ni el tiempo de vida de los analitos en el intervalo estudiado (de 0,01 a 0,40 mol L⁻¹). Como muestra la figura 9, se eligió como concentración óptima de tampón Tris 0,10 mol L⁻¹, puesto que se comprobó que a concentraciones menores existe riesgo de que la tamponación no sea efectiva.

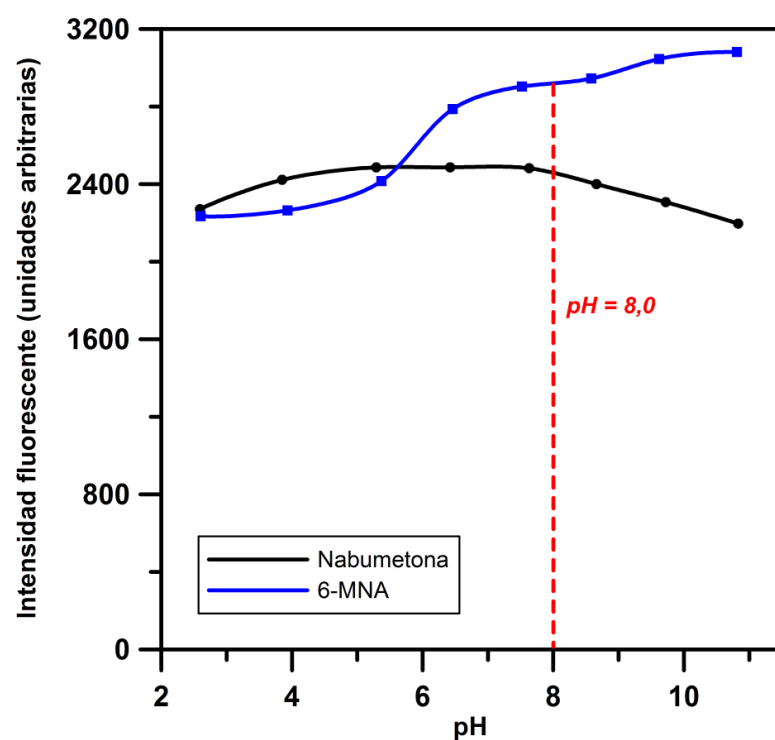


Figura 8. Influencia del pH en la fluorescencia de la nabumetona y del 6-MNA.

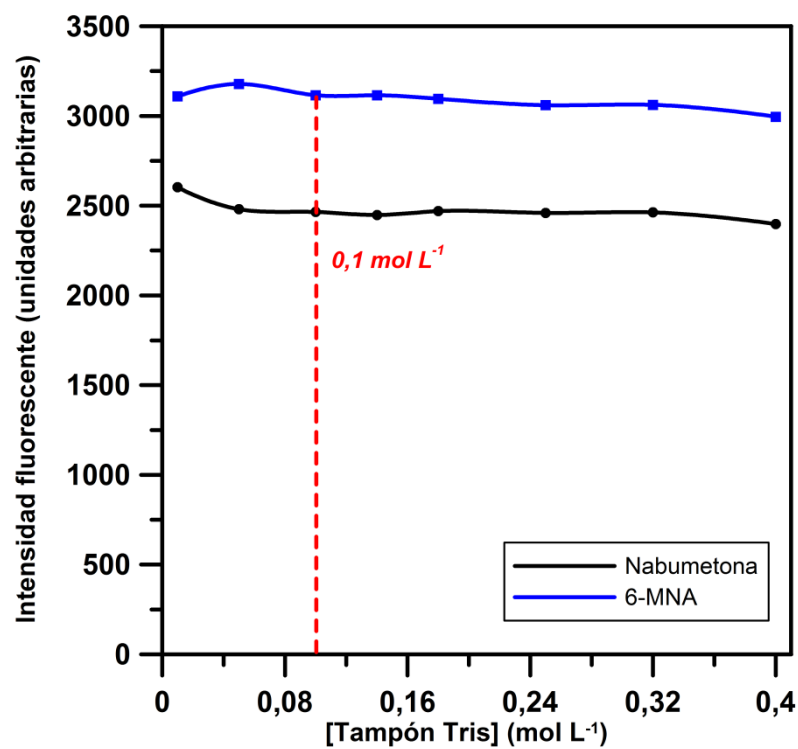


Figura 9. Influencia de la concentración de tampón Tris en la fluorescencia de la nabumetona y del 6-MNA.

4.1.3. Influencia de la temperatura

Una vez más se comprobó que la intensidad máxima de luminiscencia es inversamente proporcional a la temperatura, si bien en este caso, tal y como puede observarse en la figura 10, la disminución de la fluorescencia al aumentar la temperatura no es tan abrupta como en capítulos anteriores.

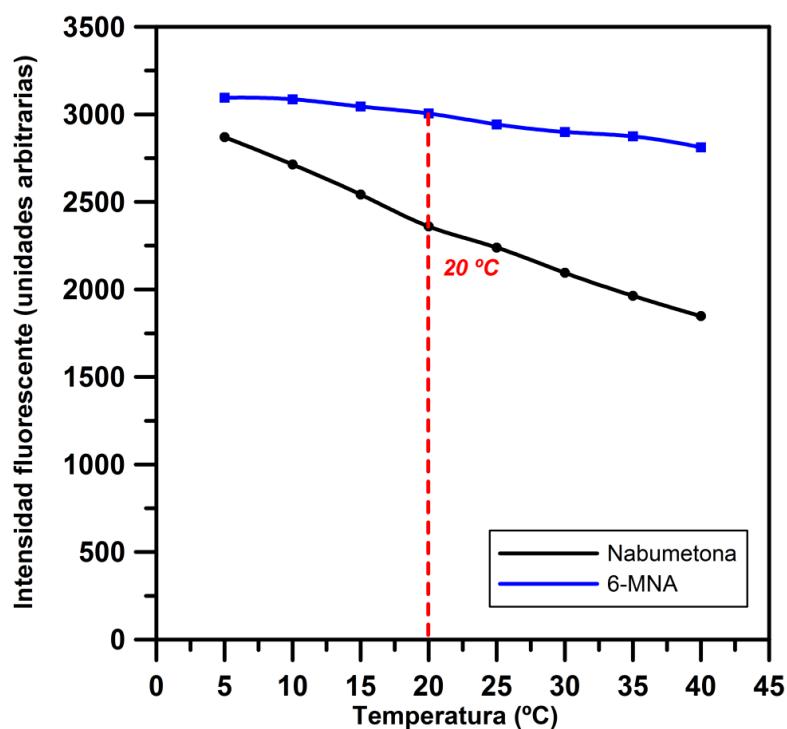


Figura 10. Influencia de la temperatura en la fluorescencia de la nabumetona y del 6-MNA.

Por razones de conveniencia práctica, ya comentadas anteriormente, se decidió trabajar a 20°C.

4.2. Optimización de variables instrumentales

Para llevar a cabo la optimización de las variables instrumentales, se utilizaron los valores seleccionados anteriormente para las variables químicas. En todos los casos se registró la curva de decaimiento luminiscente a $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 353 \text{ nm}$ entre 129 y 200 ns. Los valores iniciales para las variables instrumentales fueron los recogidos en la tabla 2.

<i>Tabla 2. Parámetros instrumentales iniciales.</i>	
Tiempo de integración	50 μs
Frecuencia	10 Hz
Número de canales	200
Número de medias	3
Número de disparos	5

4.2.1. Optimización secuencial

Se decidió optimizar de forma secuencial aquellas variables instrumentales que provocaban una variación muy grande en la intensidad de fluorescencia (concretamente, el tiempo de integración y la frecuencia de disparos). Para esta optimización se tuvo en cuenta no sólo la medida de dicha intensidad, sino también el tiempo de registro de las curvas y el ruido instrumental (calculado, como es habitual, sustrayendo a la cola de la curva de decaimiento obtenida experimentalmente la misma señal, pero tratada con un factor de 21 puntos de suavizado).

4.2.1.1. Optimización del tiempo de integración

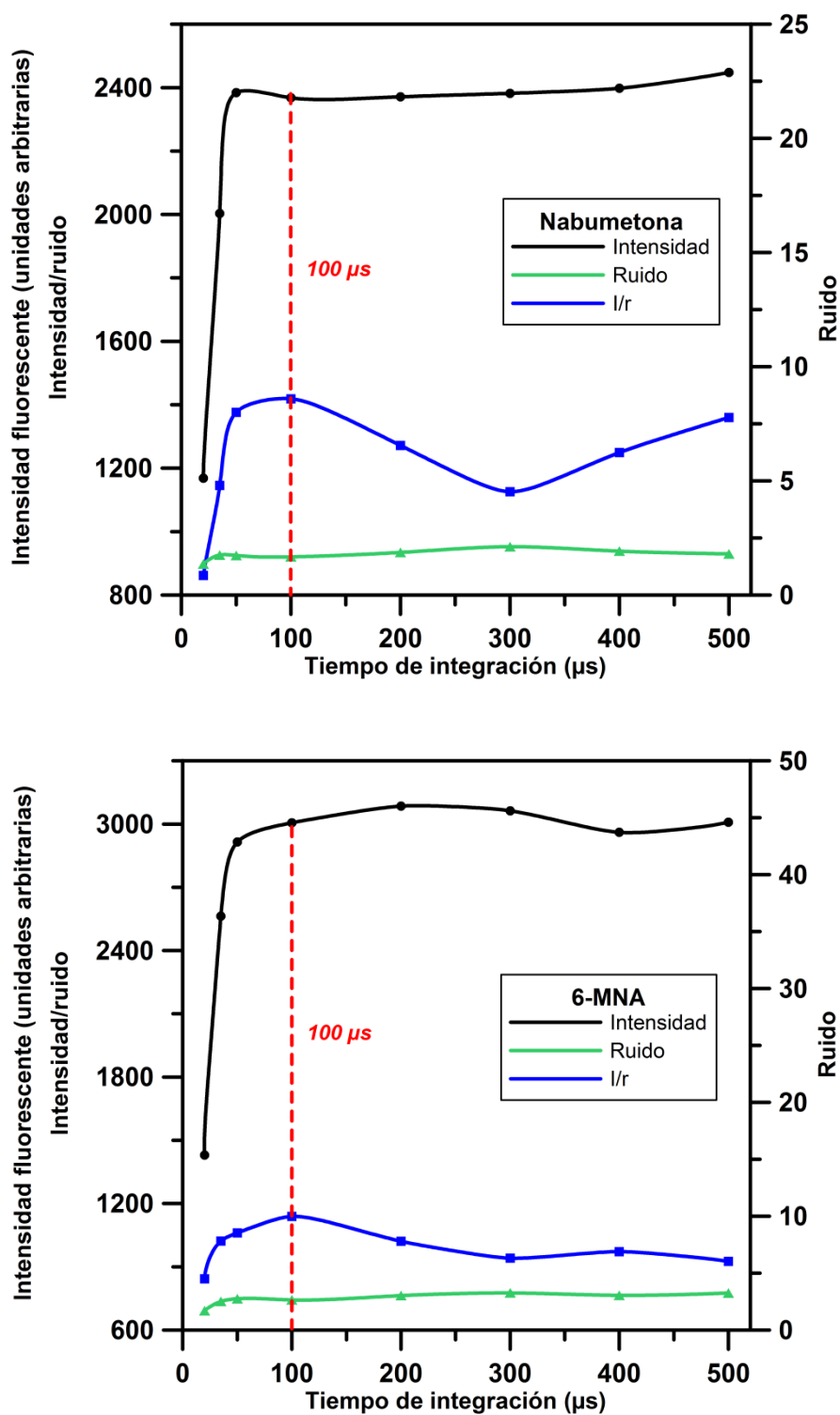
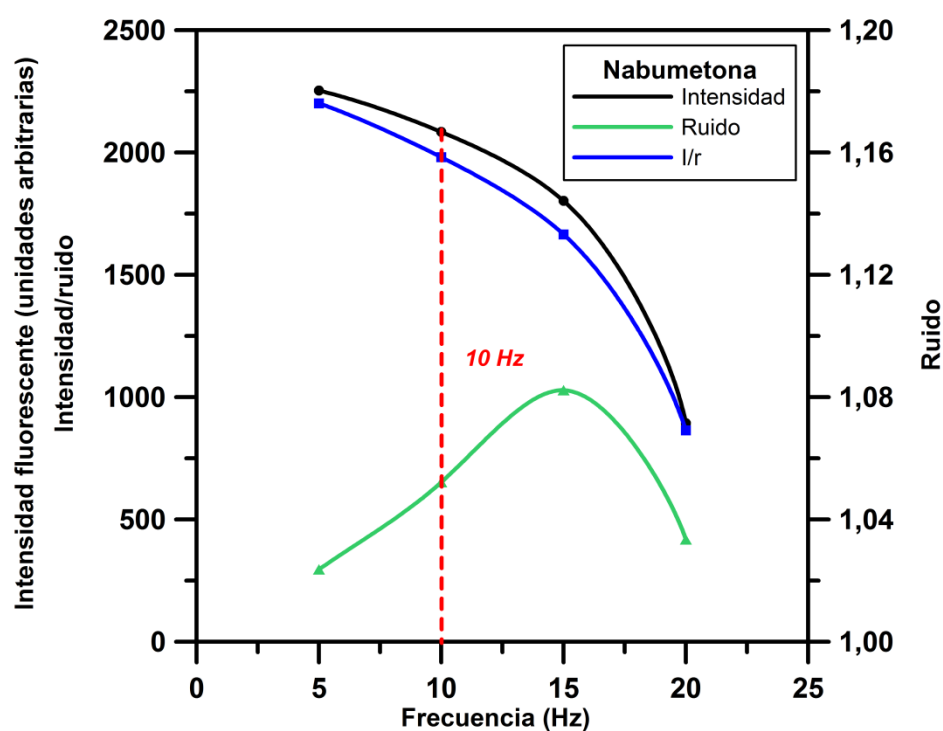


Figura 11. Influencia del tiempo de integración en la señal fluorescente de la nabumetona (arriba) y del 6-MNA (abajo).

La influencia del tiempo de integración en la señal fluorescente se estudió en un intervalo comprendido entre 20 y 500 μ s y los resultados registrados se utilizaron para elaborar las gráficas de la figura 11. Se decidió tomar como óptimo el valor de 100 μ s porque entonces se obtenía la máxima relación señal/ruido para ambos analitos. El tiempo de registro no depende del tiempo de integración.

4.2.1.2. Optimización de la frecuencia de disparos

La frecuencia, o número de disparos del láser por segundo, se estudió entre 5 y 20 Hz. La figura 12 muestra que al aumentar la frecuencia disminuyen enormemente tanto la intensidad como la relación señal ruido. Por otra parte, el tiempo de registro es tanto más largo cuanto más pequeño sea el valor escogido para la frecuencia de disparos. Teniendo en cuenta ambas tendencias, se eligió para posteriores análisis un valor de compromiso de 10 Hz.



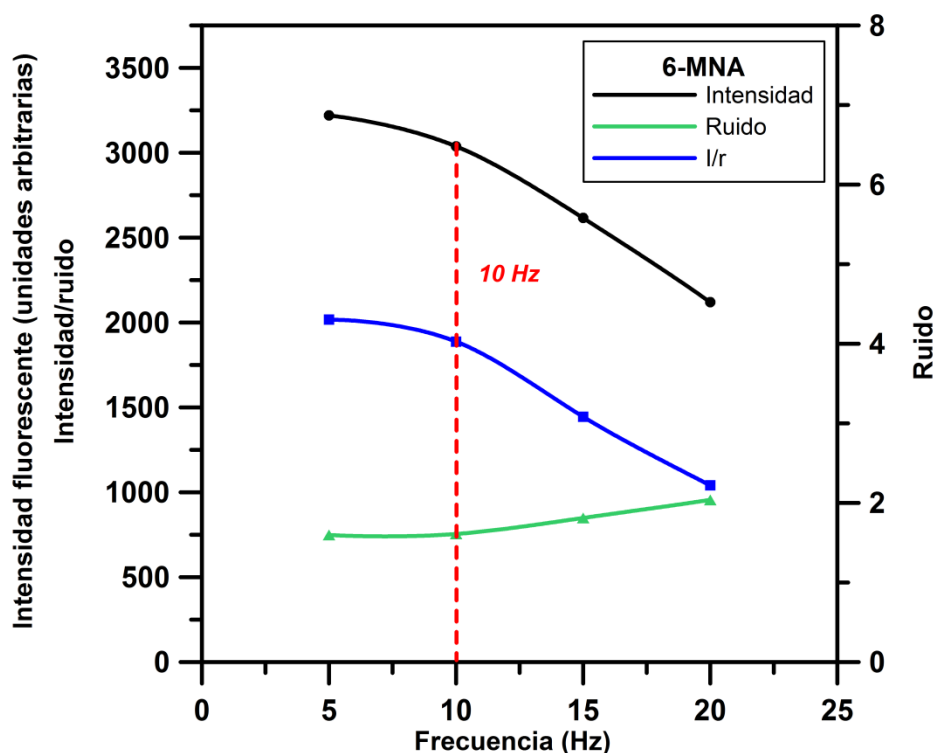


Figura 12. Influencia de la frecuencia de disparos en la señal fluorescente de la nabumetona (arriba) y del 6-MNA (abajo).

4.2.2. Optimización simplex

Se decidió abordar la optimización del resto de variables instrumentales mediante el método simplex debido a que todas ellas influyen de forma semejante tanto en el ruido instrumental como en el tiempo de registro, sin que el valor de la intensidad de fluorescencia se vea apenas alterado:

- El **número de canales** es el número de puntos que contiene cada curva de decaimiento registrada. Un mayor número de canales implica una mayor resolución y un menor ruido instrumental, a costa de un mayor tiempo de registro. En el análisis aquí recogido se decidió utilizar solamente valores que fueran múltiplos de 25.

- El **número de medias** es el número de veces que el equipo registra cada curva de decaimiento. A mayor número de medias, mayor tiempo de análisis pero también menor ruido instrumental.
- Al aumentar el **número de disparos** del láser para cada punto de la curva, disminuye el ruido instrumental y aumenta el tiempo de análisis.

Mediante simplex se buscó la maximización de la relación señal/ruido. Evidentemente, esta función es cada vez mayor cuanto mayores sean los valores de los tres parámetros en estudio, de tal manera que el punto óptimo real sólo podría alcanzarse mediante tiempos de registro inconcebiblemente elevados. Debido a esto, se decidió poner una limitación a fin de que el tiempo necesario para registrar cada curva a las condiciones que se elegirán como óptimas no fuera demasiado largo. Teniendo en cuenta el número de curvas que es necesario registrar para llevar a cabo la metodología PLS, se estableció la limitación temporal en quince minutos. Así, cada vez que el método simplex pedía una combinación de parámetros instrumentales que implicara más de quince minutos de registro por curva, se dio un valor de imagen 0, de tal manera que valores demasiado elevados para las variables fueron rechazados.

Los simplex utilizados en la optimización tienen tres dimensiones, puesto que son tres las variables a optimizar. El número de vértices de cada simplex es cuatro, es decir, uno más que el número de variables. Por tanto, su forma es tetraédrica. Los cuatro puntos del simplex inicial se escogieron siguiendo el esquema de la figura 13, de tal manera que únicamente se necesitaron dos valores diferentes (A y B) para cada una de las variables. Estos valores se eligieron de acuerdo a estudios preliminares.

En la aplicación informática [251] se introdujeron los valores de cada punto inicial, así como los de sus imágenes (las relaciones señal/ruido, es decir, I/r). El proceso de optimización se llevó a cabo tal y como se expuso en el capítulo de esta memoria dedicado a los métodos quimiométricos, eligiéndose como criterio de finalización una diferencia inferior al 5% entre la mayor y la menor relación señal/ruido de los vértices del simplex.

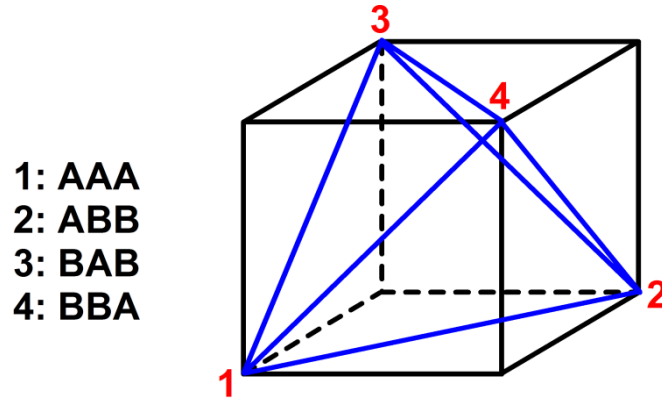


Figura 13. Distribución de los puntos del simplex inicial

4.2.2.1. Optimización simplex para la nabumetona

La figura 14 y la tabla 3 recogen todo el proceso de optimización simplex para la nabumetona.

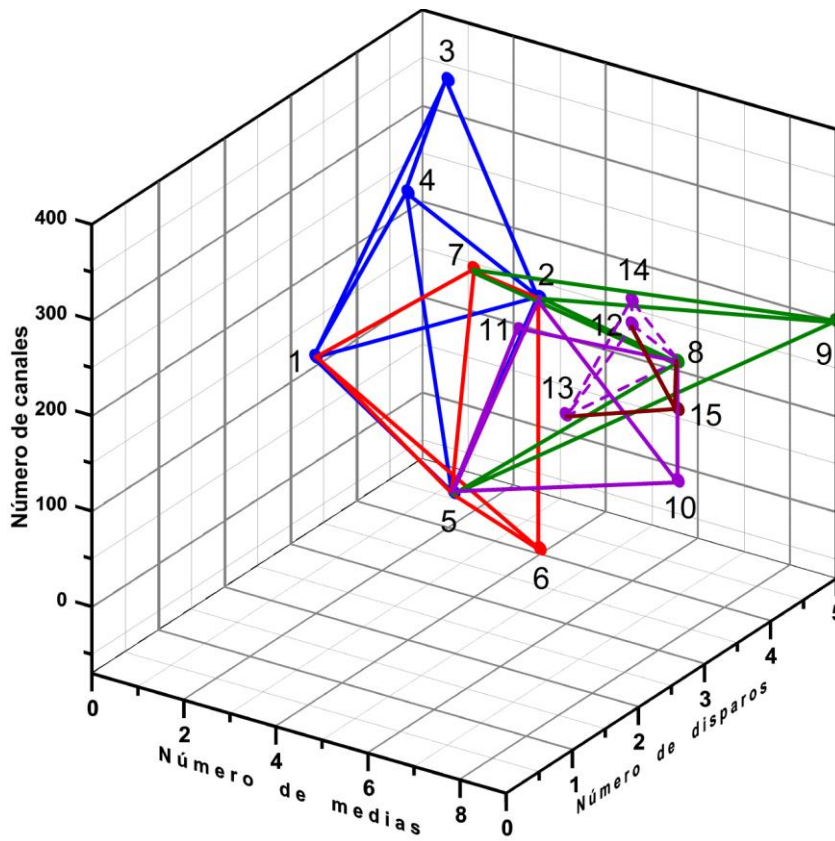


Figura 14. Optimización simplex para la nabumetona.

Tabla 3. Optimización simplex para la nabumetona
(R=reflexión; CI=contracción interna; E=expansión; N=nuevo punto).

Etapa (Caso)	Puntos del simplex	Nº canales	Nº medias	Nº disparos	$\frac{I}{r}$	Error (%)
1 (Caso 1)	1	200	2	2	1069,39	40,8
	2	200	4	4	1727,16	
	3	400	2	4	1021,68	
	4	400	4	2	1032,24	
	5 (R de 3)	100	5	2	1442,91	
2 (Caso 4a)	2	200	4	4	1727,16	40,2
	5	100	5	2	1442,91	
	1	200	2	2	1069,39	
	4	400	4	2	1032,24	
	6 (R de 4)	-75	4	4	0	
	7 (CI)	275	4	3	1425,60	
3 (Caso 2b)	2	200	4	4	1727,16	38,1
	5	100	5	2	1442,91	
	7	275	4	3	1425,60	
	1	200	2	2	1069,39	
	8 (R de 1)	175	7	4	2051,16	
	9 (E)	192	9	5	0	
4 (Caso 4b)	8	175	7	4	2051,16	30,5
	2	200	4	4	1727,16	
	5	100	5	2	1442,91	
	7	275	4	3	1425,60	
	10 (R de 7)	50	7	4	607,72	
	11 (CI)	225	5	3	1381,59	
	12 (N)	200	6	4	2004,37	
	13 (N)	150	6	3	2071,98	
	14 (N)	225	6	4	1950,80	
5 (Caso 1)	13	150	6	3	2071,98	5,8
	8	175	7	4	2051,16	
	12	200	6	4	2004,37	
	14	225	6	4	1950,80	
	15 (R de 14)	125	7	4	2039,12	

FINAL	13	150	6	3	2071,98	3,3
	8	175	7	4	2051,16	
	15	125	7	4	2039,12	
	12	200	6	4	2004,37	

Comparando con capítulos anteriores, puede comprobarse que el número de puntos experimentales necesario para la optimización mediante el método de simplex es inferior al necesario para una optimización secuencial de las variables. A fin de que pueda observarse más claramente el resultado de la optimización para la nabumetona, la figura 15 muestra únicamente el simplex de partida (en azul) y el simplex final (en rosa).

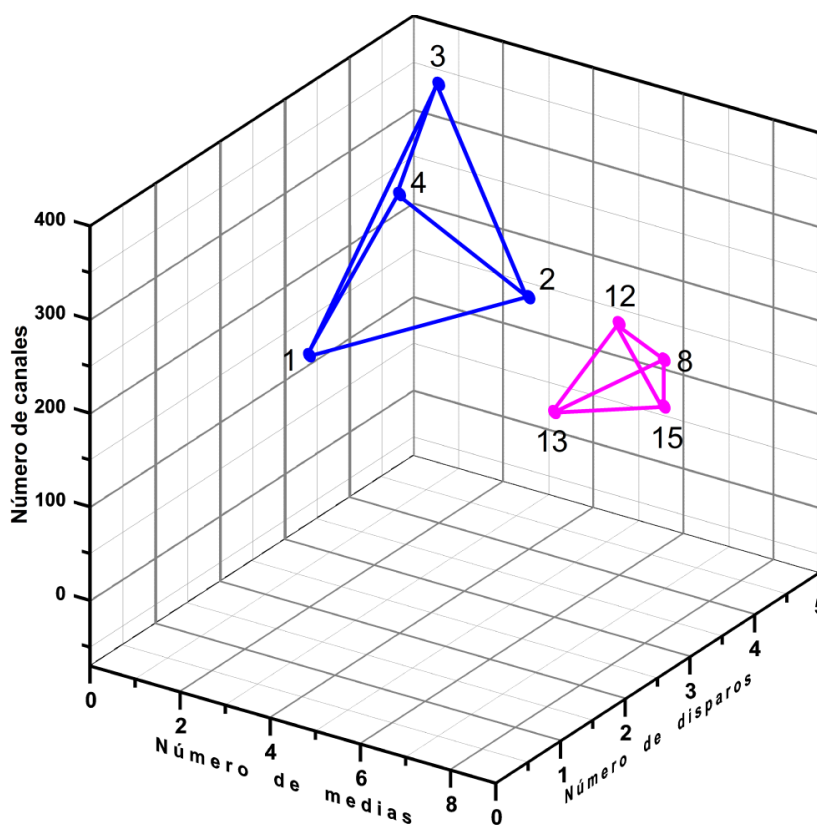


Figura 15. Simplex inicial (en azul) y final (en rosa) en la optimización simplex de la nabumetona.

Las condiciones instrumentales óptimas se determinaron haciendo la media aritmética de los correspondientes valores de los cuatro puntos del simplex final. Se

analizó una muestra en dichas condiciones y se calculó su relación señal/ruido, la cual, como muestra la tabla 4, se encuentra efectivamente entre la de los cuatro puntos del simplex final.

Tabla 4. Variables instrumentales optimizadas por el método simplex para la nabumetona.			
Nº Canales	Nº Medias	Nº Disparos	$\frac{I}{r}$
175	7	4	2055,18

4.2.2.2. Optimización simplex para el 6-MNA

El procedimiento fue análogo para llevar a cabo la optimización simplex para el 6-MNA. Este procedimiento se halla representado en la figura 16 y detallado en la tabla 5.

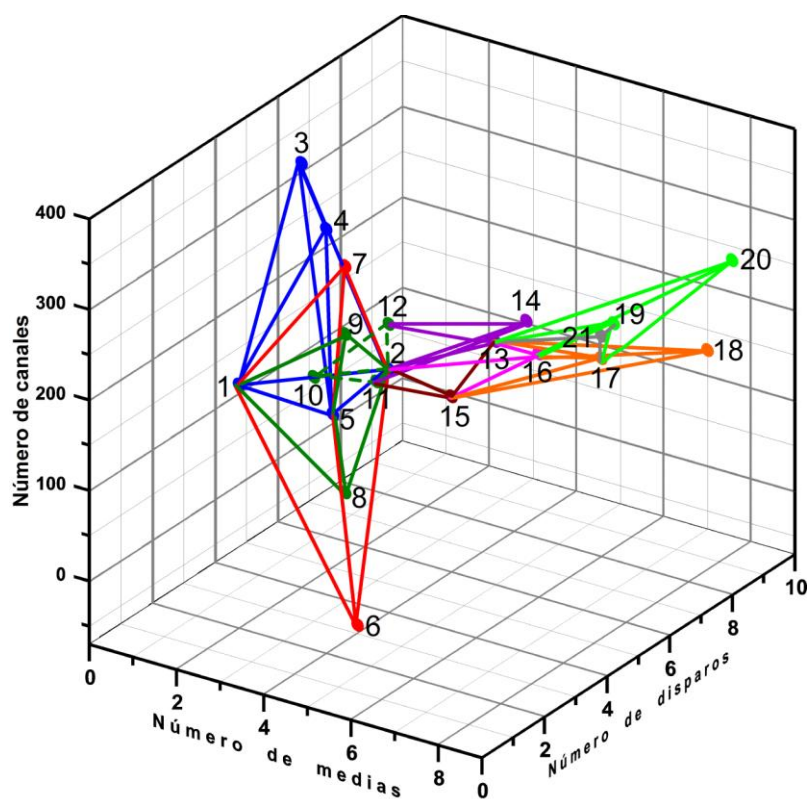


Figura 16. Optimización simplex para el 6-MNA.

Tabla 5. Optimización simplex para el 6-MNA
(R=reflexión; CI=contracción interna; E=expansión; N=nuevo punto).

Etapa (Caso)	Puntos del simplex	Nº canales	Nº medias	Nº disparos	$\frac{I}{r}$	Error (%)
1 (Caso 1)	1	200	2	2	1798,60	48,8
	2	200	4	4	2278,38	
	3	400	2	4	1242,70	
	4	400	4	2	1166,96	
	5 (R de 4)	100	2	5	1759,29	
2 (Caso 4a)	2	200	4	4	2278,38	45,4
	5 (R de 4)	100	2	5	1759,29	
	1	200	2	2	1798,60	
	3	400	2	4	1242,70	
	6 (R de 3)	-60	4	3	0	
	7 (CI)	300	3	4	1463,36	
3 (Caso 4b)	2	200	4	4	2278,38	35,8
	1	200	2	2	1798,60	
	5	100	2	5	1759,29	
	7	300	3	4	1463,36	
	8 (R de 7)	50	3	4	1451,58	
	9 (CI)	225	3	4	1271,40	
	10 (N)	200	3	3	1193,71	
	11 (N)	150	3	5	2050,54	
	12 (N)	250	4	4	1659,45	
4 (Caso 2b)	2	200	4	4	2278,38	47,6
	11	150	3	5	2050,54	
	12	250	4	4	1659,45	
	10	200	3	3	1193,71	
	13 (R de 10)	200	5	6	2721,11	
	14 (E)	200	5	7	2642,25	
5 (Caso 1)	13	200	5	6	2721,11	39,0
	2	200	4	4	2278,38	
	11	150	3	5	2050,54	
	12	250	4	4	1659,45	
	15 (R de 12)	125	4	6	2373,15	

6 (Caso 1)	13	200	5	6	2721,11	24,6
	15	125	4	6	2373,15	
	2	200	4	4	2278,38	
	11	150	3	5	2050,54	
	16 (R de 11)	200	6	6	2397,49	
7 (Caso 2b)	13	200	5	6	2721,11	16,3
	16	200	6	6	2397,49	
	15	125	4	6	2373,15	
	2	200	4	4	2278,38	
	17 (R de 2)	150	6	8	2794,04	
	18 (E)	125	7	10	0	
8 (Caso 2b)	17	150	6	8	2794,04	15,1
	13	200	5	6	2721,11	
	16	200	6	6	2397,49	
	15	125	4	6	2373,15	
	19 (R de 15)	225	7	7	2840,21	
	20 (E)	300	9	8	0	
9 (Caso 1)	19	225	7	7	2840,21	15,6
	17	150	6	8	2794,04	
	13	200	5	6	2721,11	
	16	200	6	6	2397,49	
	21 (R de 16)	175	6	8	2825,55	
FINAL	19	225	7	7	2840,21	4,2
	21	175	6	8	2825,55	
	17	150	6	8	2794,04	
	13	200	5	6	2721,11	

Para mostrar el resultado con una mayor claridad, en la figura 17 se ha representado únicamente el simplex de partida (en azul) y el simplex final (en negro).

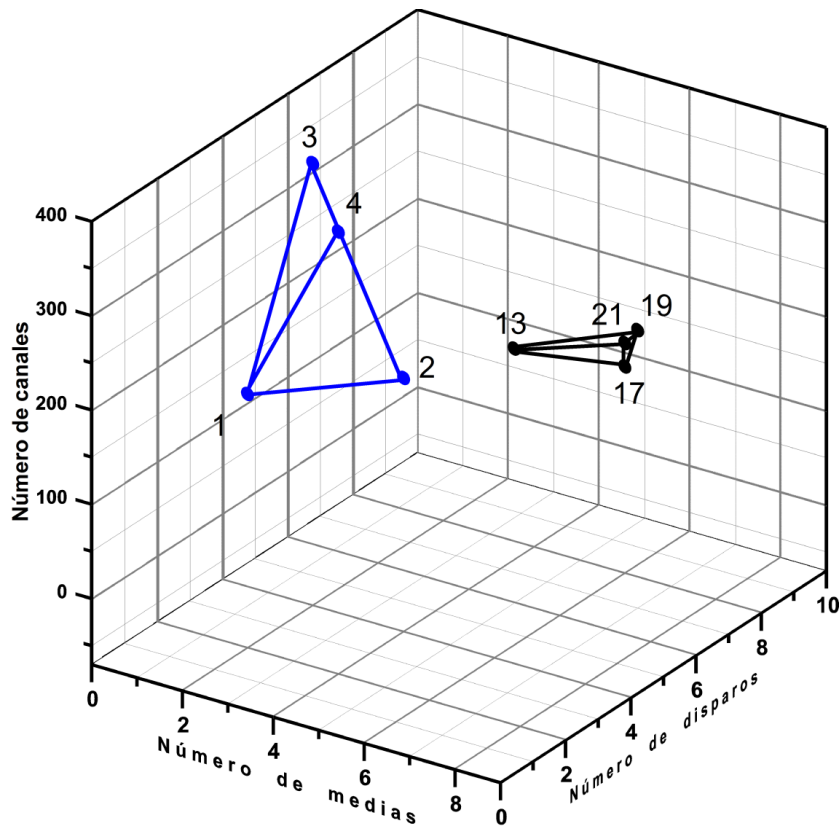


Figura 17. Simplex inicial y final en la optimización simplex del 6-MNA.

La tabla 6 contiene las condiciones instrumentales óptimas (media aritmética de todos los puntos del simplex final) y la relación señal/ruido obtenida al analizar una muestra de 6-MNA en esas condiciones.

Tabla 6. Variables instrumentales optimizadas por el método simplex para el 6-MNA.			
Nº Canales	Nº Medias	Nº Disparos	$\frac{I}{r}$
175	6	7	2806,67

Por tanto, el número de canales óptimo hallado es el mismo para los dos analitos. Sin embargo, el número de medias y de disparos difiere ligeramente, debido a la orientación que inicialmente tomó el simplex en cada caso (aumentando las medias en el caso de la nabumetona y aumentando el número de disparos en el caso del 6-MNA). Puesto que, estadísticamente, resulta más ventajoso realizar un mayor número de medias que aumentar el número de disparos del láser por curva, se decidió elegir como condiciones óptimas para el análisis simultáneo de los analitos 7 medias (el valor óptimo para la nabumetona) y 5 disparos (ya que un mayor número de disparos con ese número de medias implicaba tiempos de análisis excesivamente largos).

La tabla 7 resume los valores óptimos elegidos para todas las variables estudiadas, tanto químicas como instrumentales.

<i>Tabla 7. Valores óptimos escogidos para todos los parámetros estudiados.</i>	
Variables químicas	
% EtOH	80 % v/v
pH	8,0
[Tampón Tris]	0,1 mol L ⁻¹
Temperatura	20 °C
Variables instrumentales	
Tiempo de integración	100 µs
Frecuencia	10 Hz
Número de canales	175
Número de medias	7
Número de disparos	5

5. Estudio de la linealidad

Una vez completado el proceso de optimización de las variables químicas e instrumentales que influyen en las curvas de decaimiento fluorescente de la nabumetona y del 6-MNA, se llevó a cabo un estudio para determinar en qué intervalo las respuestas instrumentales son lineales con respecto a las concentraciones de los analitos. Como ya se ha indicado, este hecho es un requisito para poder aplicar el modelo de calibración multivariante PLS-1.

Se estudió un intervalo dinámico comprendido entre 1,0 y 10000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, dentro del cual se registraron disoluciones con diferentes concentraciones de los dos analitos en las condiciones químicas e instrumentales óptimas. Como puede verse tanto en la figura 18 como en las ampliaciones de la figura 19, la respuesta es lineal entre 1,0 y 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la nabumetona y entre 1,0 y 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el 6-MNA, con coeficientes de la determinación (ajuste mediante mínimos cuadrados) muy cercanos a la unidad en ambos casos.

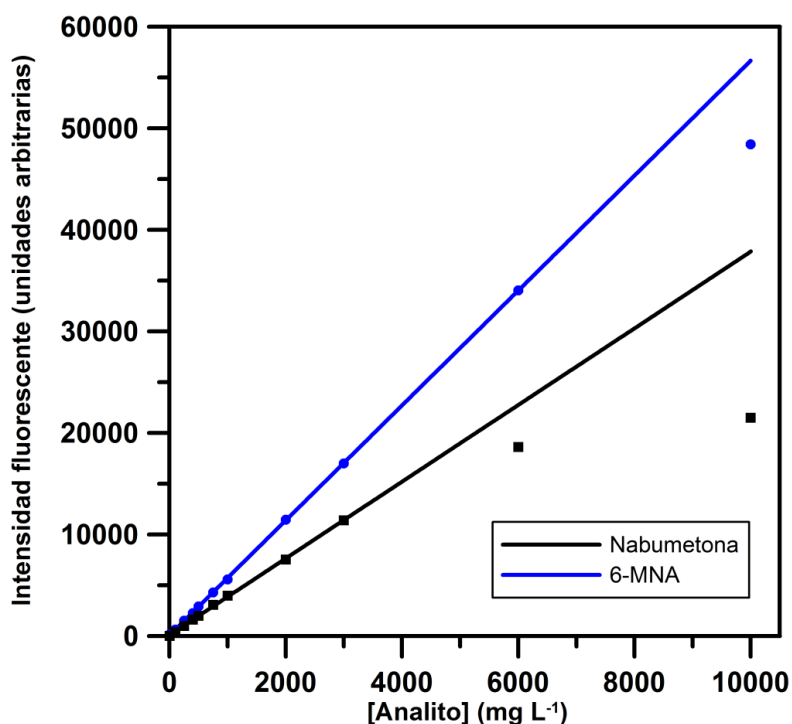


Figura 18. Estudio de linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de la nabumetona y del 6-MNA.

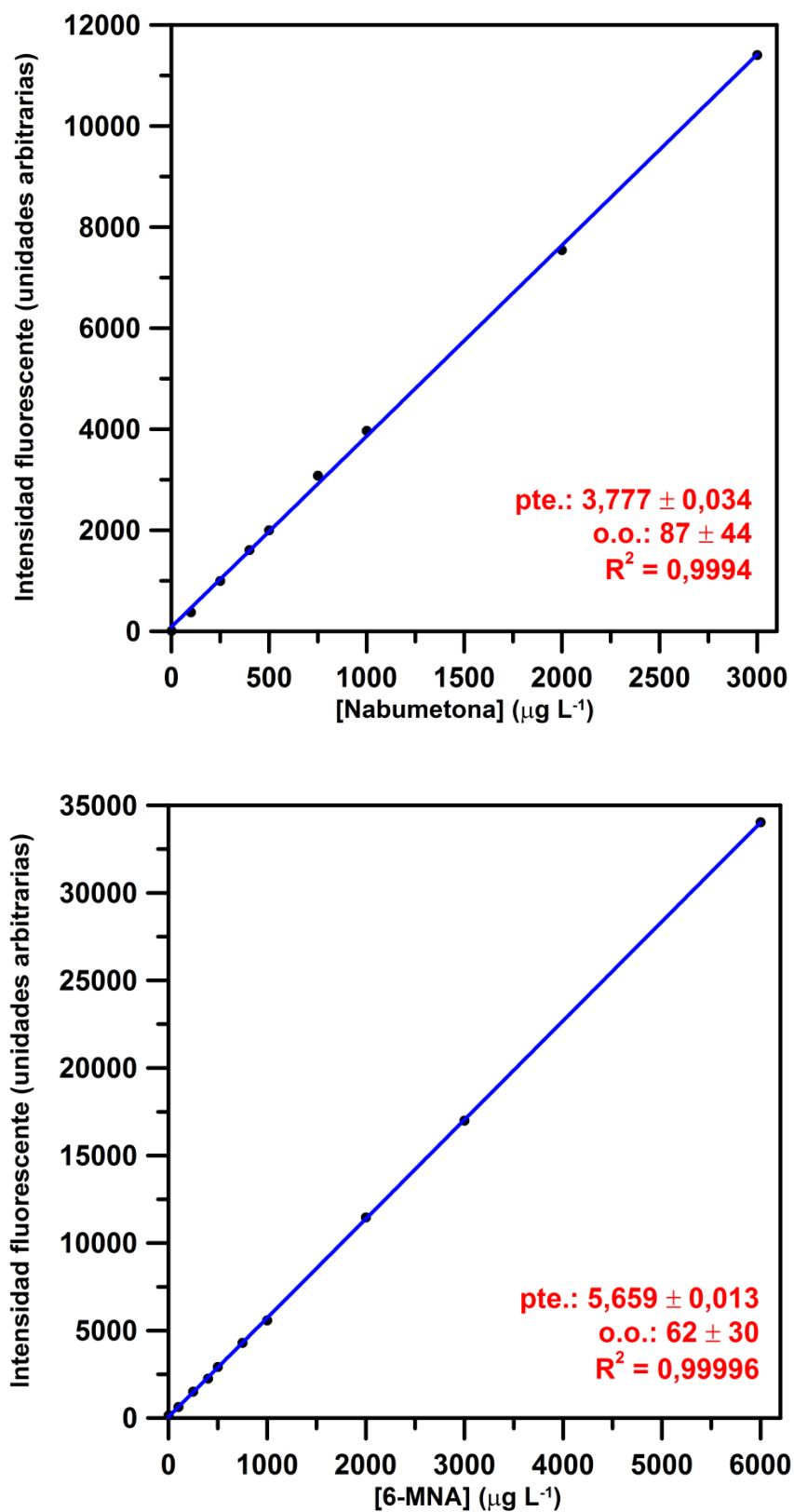


Figura 19. Intervalos de respuesta lineal entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de la nabumetona(arriba) y el 6-MNA (abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

6. Aplicación del modelo PLS-1

6.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración

En el diseño de la matriz de calibración multivariante se tuvo en cuenta tanto los intervalos de linealidad obtenidos como la intensidad fluorescente relativa de los dos analitos. Puesto que aun mismo nivel de concentración se obtiene mayor señal para el 6-MNA que para la nabumetona y, además, la sensibilidad en la determinación del primero es mayor, se decidió tratar de igualar la contribución de ambos analitos a las curvas de decaimiento de la matriz estableciendo el rango del 6-MNA a concentraciones ligeramente menores. Así, se eligió una concentración máxima de $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para éste, y de $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para la nabumetona.

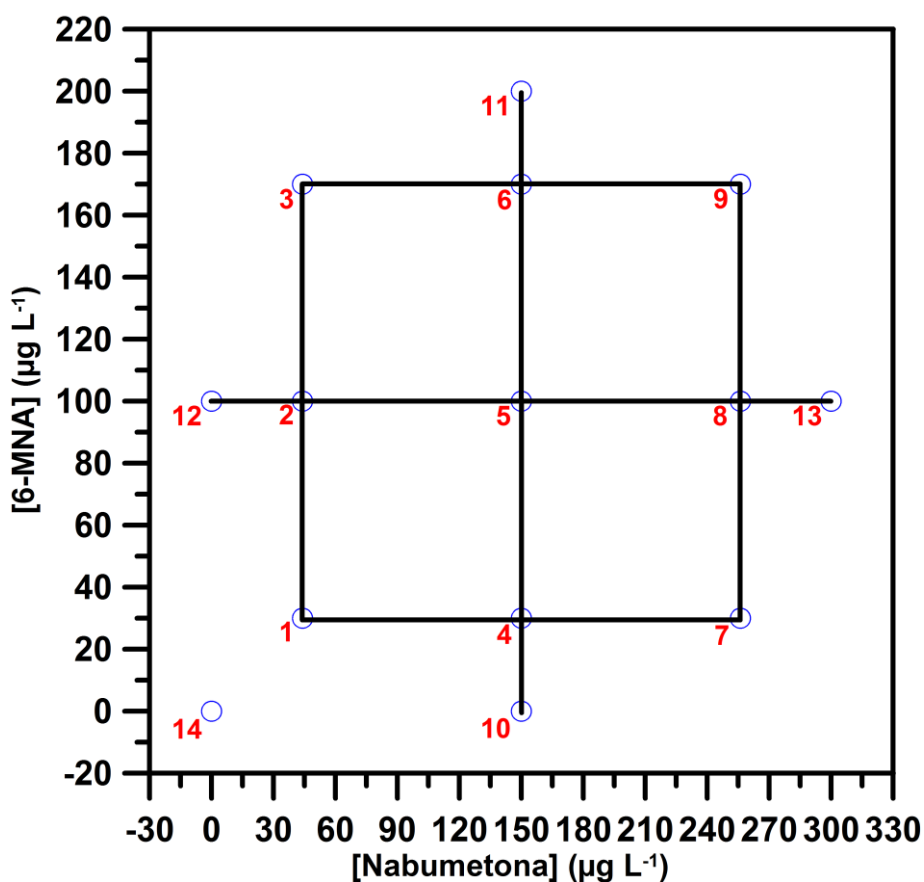


Figura 20. Representación gráfica del esquema utilizado en la matriz de calibración.

Como el diseño factorial con tres niveles por factor combinado con el diseño central compuesto (trece muestras de calibración) incluye información tanto de las curvas de decaimiento de los complejos individuales como de diferentes mezclas a niveles de concentración altos y bajos, se consideró que era el más adecuado para la resolución de mezclas binarias. Como puede verse en la figura 20 y en la tabla 8, se incluyó asimismo un blanco analítico, a fin de maximizar estadísticamente la información contenida en las curvas de decaimiento.

<i>Tabla 8. Concentraciones de los analitos en cada punto de la matriz de calibración.</i>		
Muestra	[Nabumetona] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[6-MNA] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	44,0	30,0
2	44,0	100,0
3	44,0	170,0
4	150,0	30,0
5	150,0	100,0
6	150,0	170,0
7	256,0	30,0
8	256,0	100,0
9	256,0	170,0
10	150,0	0
11	150,0	200,0
12	0	100,0
13	300,0	100,0
14	0	0

En la figura 21 aparecen representadas las catorce curvas de decaimiento fluorescente, registradas en las condiciones químicas e instrumentales óptimas.

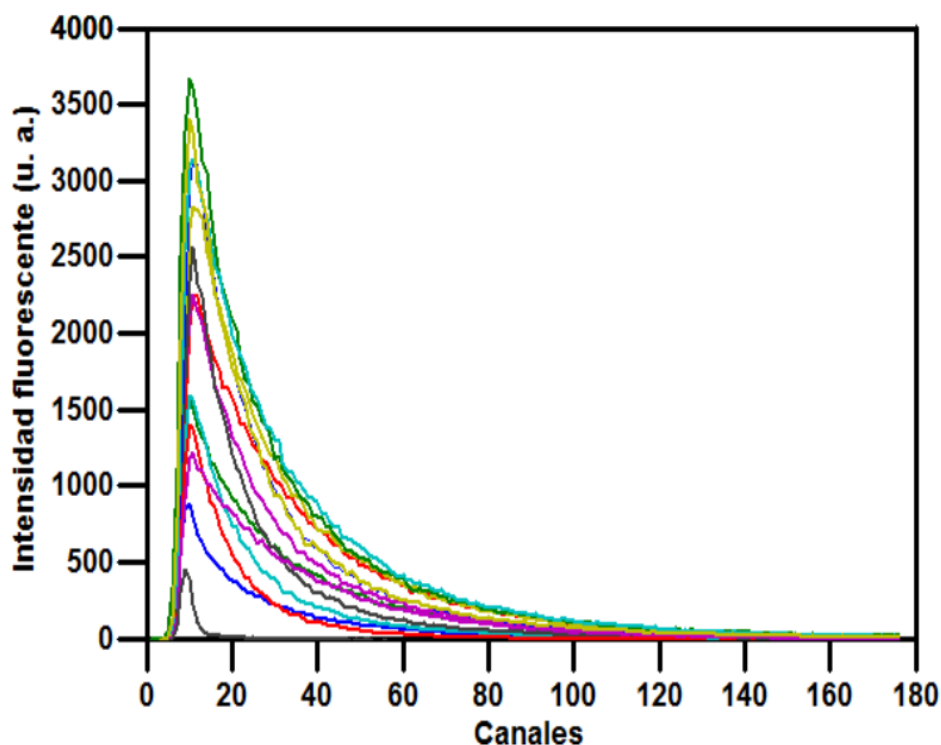


Figura 21. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

Las curvas mostradas en la figura 21 se exportaron a archivos de texto y se utilizó la subrutina MVC-1 de Matlab [252] para desarrollar el mejor modelo de calibración posible, lo cual, como es bien sabido, implica un estudio del número de factores, de los intervalos temporales a introducir y de la posible presencia de puntos discrepantes. Como algoritmo se utilizó en todos los casos el PLS-1, por ser el que presenta más ventajas [274].

La optimización del número de factores para cada analito se llevó a cabo mediante el método de las validaciones cruzadas, introduciendo inicialmente en la subrutina de Matlab un valor previsiblemente mayor que el necesario para una mezcla binaria (en este caso, se introdujo seis). Siguiendo el criterio de Haaland y Thomas [238] (el número óptimo de factores es el número de factores más bajo para el cual la probabilidad para la razón $F(P)$ es igual o menor que 0,75), se obtuvo que el número óptimo de factores es tres para ambos componentes.

Asimismo, se ensayaron diversos intervalos temporales de las curvas de decaimiento introducidas en la matriz ya que, aunque la subrutina MVC-1 permite trabajar con la curva de decaimiento completa, a veces esto no resulta ventajoso por considerar zonas que no contienen información relevante acerca de los analitos en estudio, de tal forma que los resultados obtenidos pueden verse influenciados negativamente. No obstante, este no es el caso, ya que los mejores resultados estadísticos (R^2 más cercano a la unidad y errores SEP y REP lo más bajos posible) se obtuvieron cuando se analizó el intervalo de puntos completo, tanto para la nabumetona como para el 6-MNA.

Por último, se comprobó que no existía ningún punto discrepante, ya que la razón F fue en todos los casos inferior a la unidad [238]. Los resultados estadísticos de la etapa de la calibración aparecen resumidos en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Optimización del número de factores (canales del 1 al 175).

	Nabumetona			6-MNA		
Número de factores	PRESS	F	P	PRESS	F	P
0	154610	182,84	0,999	61353	344,98	0,999
1	84110	99,47	0,999	19416	109,17	0,999
2	5370,3	6,35	0,999	1297,3	7,29	0,999
3	855,64	1,01	0,508	193,82	1,09	0,560
4	845,59	1	0,499	223,75	1,26	0,657
5	1209,4	0	0	181,93	1,02	0,516
6	1521,1	0	0	177,84	1	0,499

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R^2
Nabumetona	3	7,8	5,6	0,993
6-MNA	3	3,9	4,4	0,996

6.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)

Se prepararon diez muestras con concentraciones de ambos analitos comprendidas dentro de los intervalos de calibración y, gracias al uso del programa de generación de números aleatorios [253], repartidas dentro de los mismos. Estas muestras se analizaron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, obteniéndose las curvas de la figura 22.

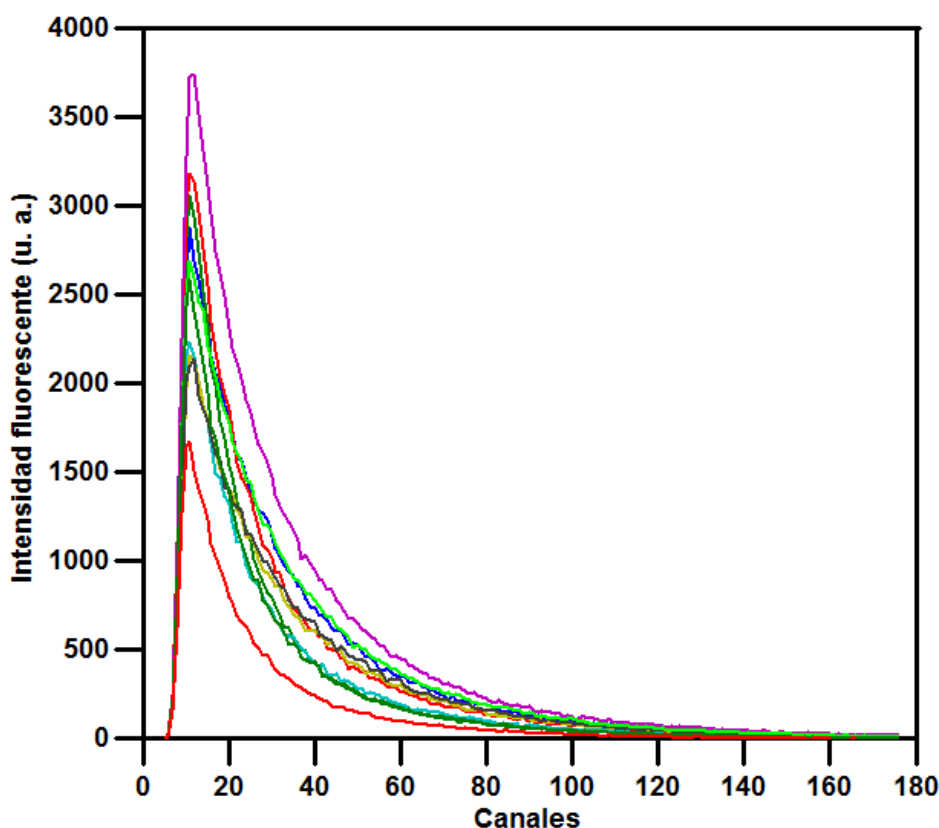


Figura 22. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

A fin de validar el método, se utilizó la matriz de calibración desarrollada previamente para calcular el contenido en nabumetona y 6-MNA de cada una de las muestras de predicción, obteniéndose los resultados contenidos en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Predicción del contenido en nabumetona de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S _d	RES (%)	Recuperación (%)
1	132,0	134,1	3,2	2,1	101,6
2	300,0	308,6	4,2	2,2	102,9
3	270,0	263,8	3,6	2,2	97,7
4	170,0	165,1	2,3	2,3	97,1
5	198,0	205,5	4,7	2,1	103,8
6	82,0	80,7	2,8	2,4	98,4
7	58,0	59,6	3,0	2,3	102,7
8	96,0	100,2	3,3	1,7	104,3
9	230,0	230,7	2,9	2,3	100,3
10	142,0	145,0	2,3	2,8	102,1

Tabla 12. Predicción del contenido en 6-MNA de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S _d	RES (%)	Recuperación (%)
1	162,0	162,9	1,7	2,1	100,5
2	48,0	49,1	2,2	2,2	102,3
3	102,0	103,6	1,9	2,2	101,6
4	78,0	80,5	1,2	2,3	103,2
5	196,0	199,7	2,5	2,1	101,9
6	140,0	136,7	1,5	2,4	97,7
7	152,0	150,0	1,6	2,3	98,7
8	180,0	175,8	1,8	1,7	97,7
9	60,0	60,3	1,6	2,3	100,5
10	32,0	33,6	1,2	2,8	104,9

Además de obtenerse en todos los casos porcentajes de recuperación próximos al 100 %, la representación de las concentraciones de los analitos que el modelo PLS-1 predice frente a las concentraciones añadidas mostró una tendencia marcadamente lineal en ambos casos (véase la figura 23, en la que los datos se hallan ajustados a rectas mediante el método de mínimos cuadrados).

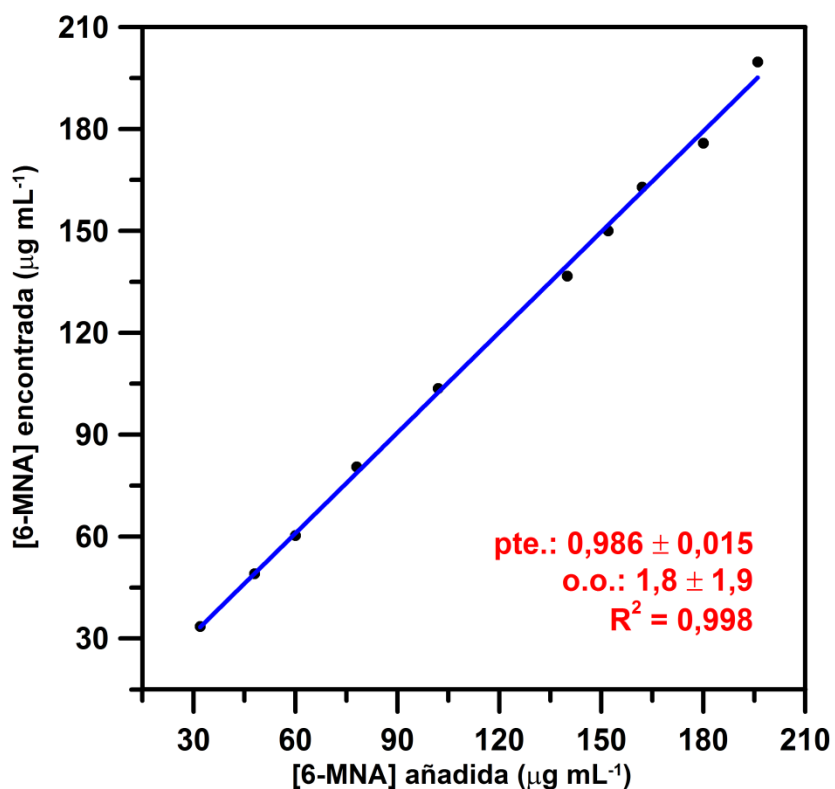
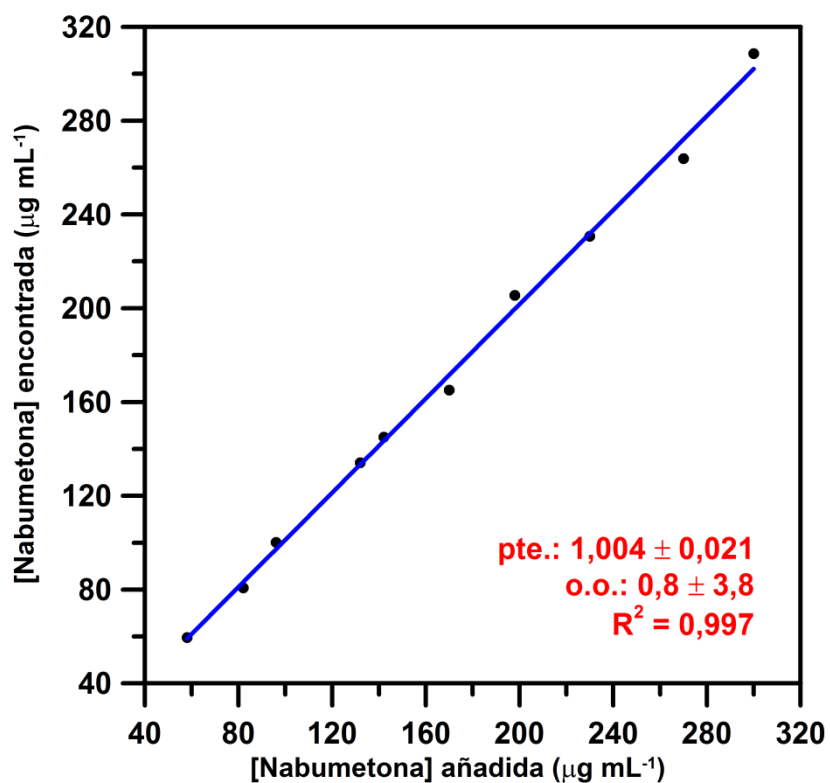


Figura 23. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para la nabumetona (arriba) y para el 6-MNA(abajo), y ajustes a rectas mediante mínimos cuadrados.

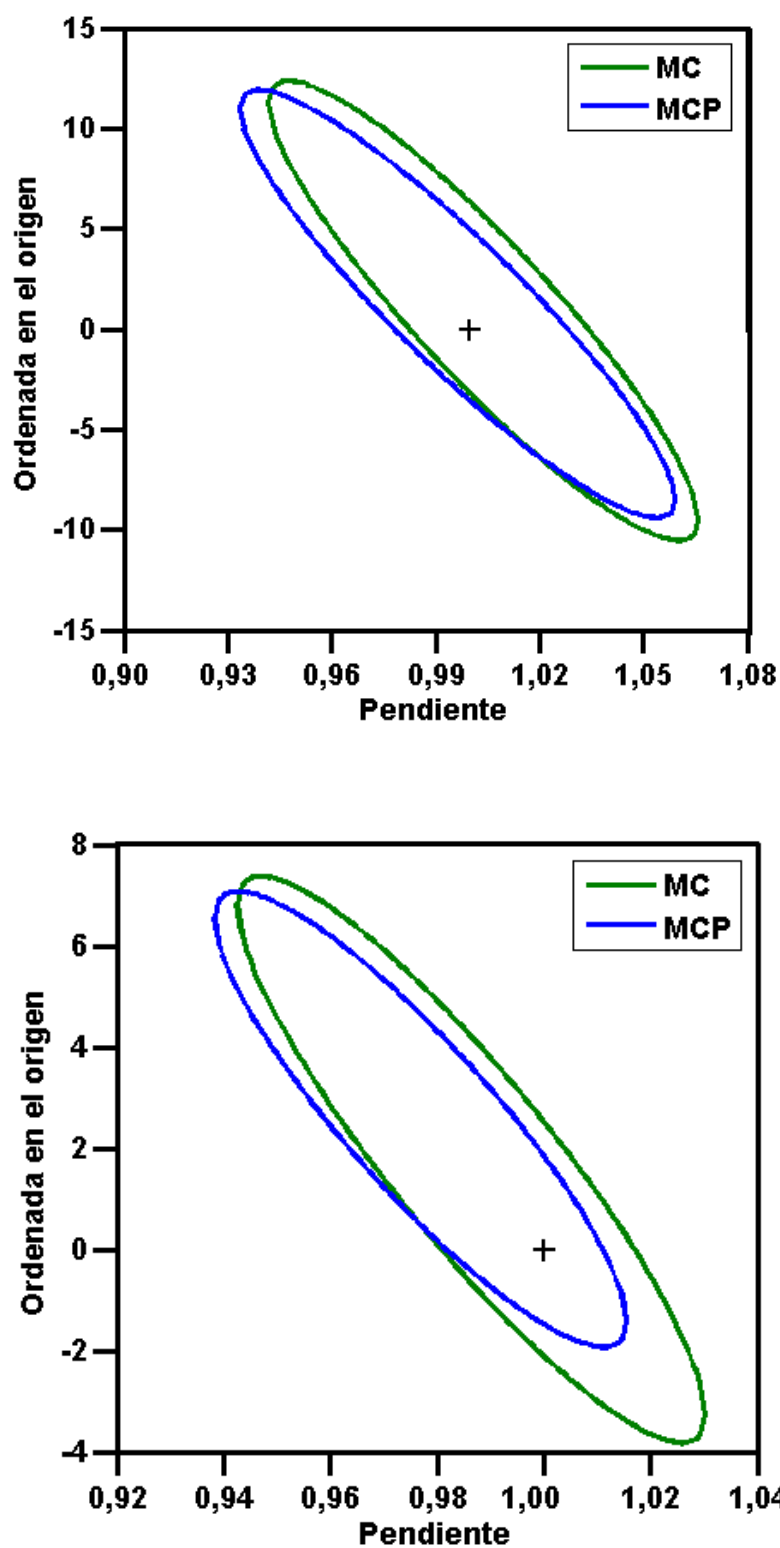


Figura 24. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para la nabumetona (arriba) y el 6-MNA (abajo), considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (en verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (en azul).

En la figura 23 puede constatarse que las rectas obtenidas al representar los valores de concentración calculada frente a concentración añadida tienen como pendiente un valor próximo a la unidad y como ordenada en el origen un número cercano al 0, lo cual es indicativo de la gran calidad del ajuste. De hecho, la figura 24 muestra que el punto (1,0) se encuentra dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen a un nivel de confianza del 95%. Esto quiere decir que, para ambos analitos, las diferencias entre los valores teóricos y experimentales de la pendiente y de la ordenada en el origen no son estadísticamente significativas a dicho nivel de confianza [275].

7. Cálculo de los límites de detección

Al igual que en trabajos anteriores, los límites de detección se calcularon aquí según el criterio desarrollado por nuestro grupo de investigación [224, 276], el cual sigue las recomendaciones de la IUPAC [240], pues considera un factor de seguridad de tres, la desviación estándar de diez replicados del blanco analítico y la pendiente de la recta que relaciona las concentraciones de analito añadidas y las encontradas mediante la metodología de calibración multivariante. Todos estos parámetros se recogen en la tabla 13 para ambos analitos.

<i>Tabla 13. Cálculo de los límites de detección (LD).</i>			
Analito	S_b (µg L⁻¹)	b	LD (µg L⁻¹)
Nabumetona	0,32	1,00	0,96
6-MNA	0,29	0,99	0,88

Los valores calculados de los límites de detección son los esperados para métodos fluorescentes que determinan nabumetona y 6-MNA [358].

8. Estudio de la precisión del método

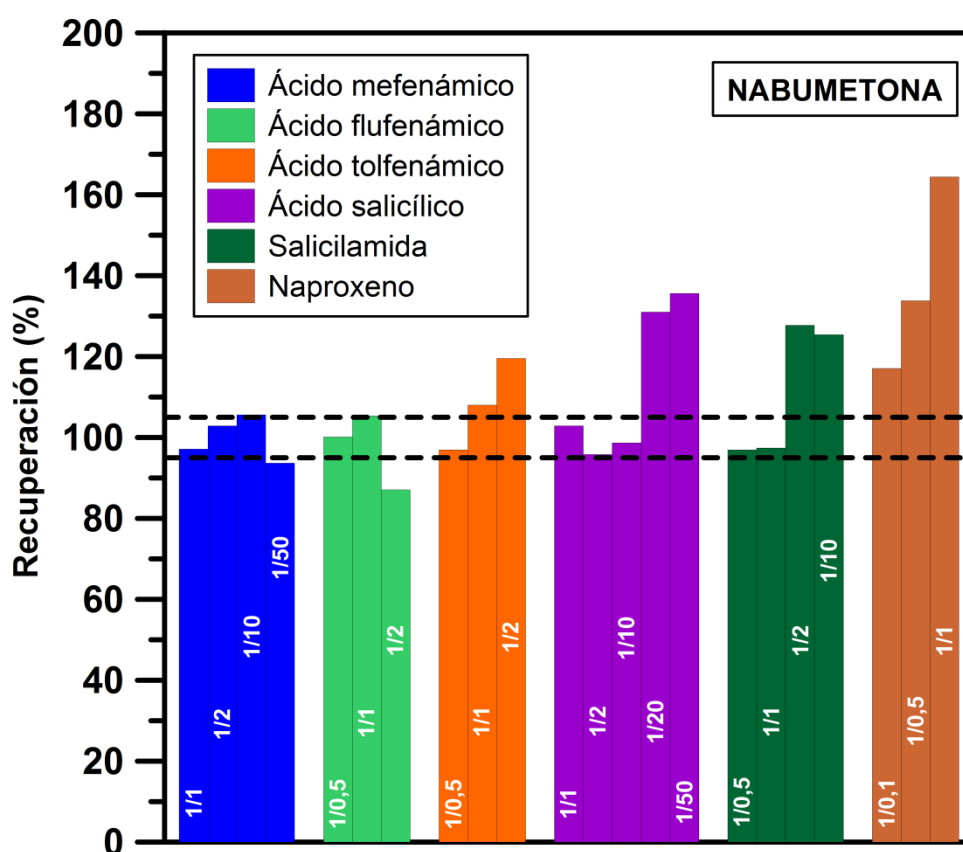
Se preparó, registró y predijo una serie de diez replicados de una disolución que contenía $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de nabumetona y $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de 6-MNA para estudiar la precisión del método propuesto. La tabla 14 recoge los resultados de dicho estudio.

<p><i>Tabla 14. Predicción de diez replicados de una muestra que contenía $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de nabumetona y $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de 6-MNA.</i></p>		
Muestra	[Nabumetona] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[6-MNA] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	72,8	98,96
2	76,6	101,26
3	73,1	99,13
4	76,8	99,93
5	74,6	98,82
6	72,9	99,97
7	74,8	99,30
8	74,8	100,11
9	76,7	99,44
10	74,9	100,59
Valor medio	$74,8 \pm 1,5$	$99,75 \pm 0,77$

Como puede verse, las concentraciones medias estimadas fueron $74,8 \pm 1,5$ y $99,75 \pm 0,77$ para la nabumetona y el 6-MNA, respectivamente, lo cual es indicativo de las altas exactitud y precisión que tiene el método desarrollado.

9. Estudio de la selectividad del método

Se comprobó el efecto que tiene en la determinación de nabumetona y su principal metabolito, el 6-MNA, por el método propuesto la presencia de otros compuestos pertenecientes a la familia de los AINEs. Este estudio implicó el registro y la predicción de muestras sintéticas que contenían $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ambos analitos en estudio, así como cantidades variables del posible interferente. Se comenzó siempre con la proporción 1/1 y se subió o bajó dependiendo de si aparecía interferencia o no. En la figura 25 se muestran los resultados de forma que pueda verse qué muestras superaban un $\pm 5\%$ de error en su porcentaje de recuperación (criterio utilizado para decidir la proporción a la cual un compuesto interfiere).



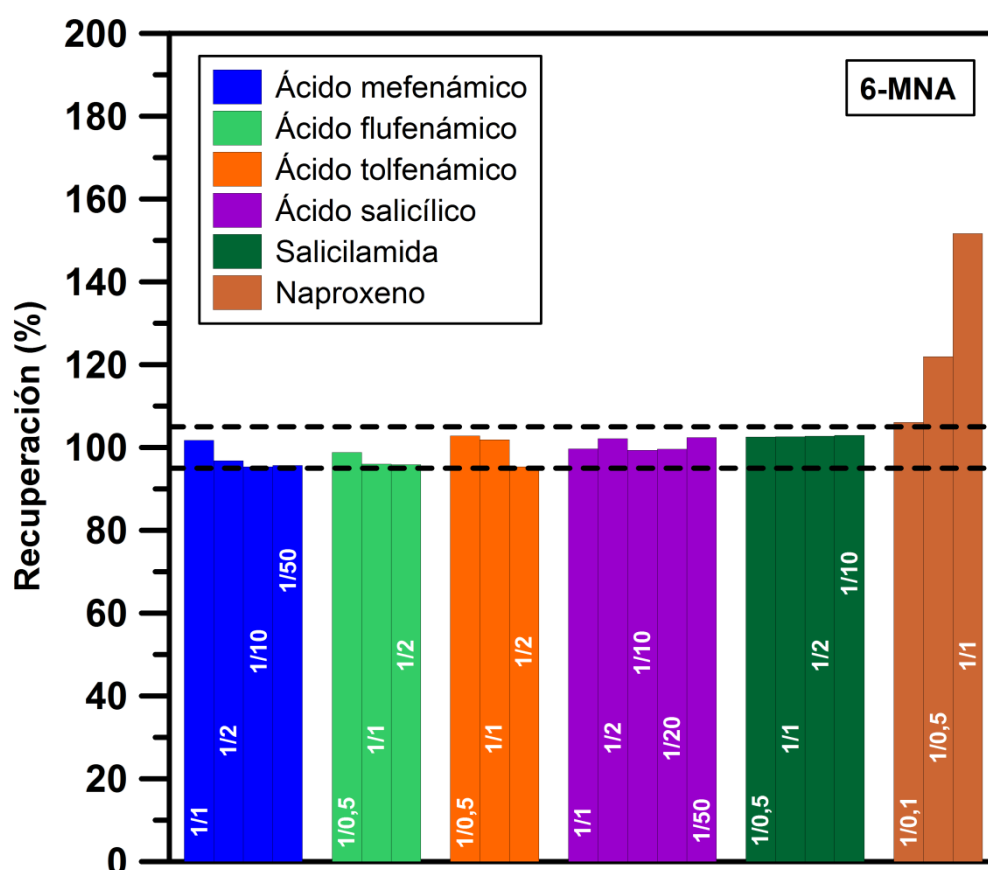


Figura 25. Diagramas de barras para el estudio de interferencias en la determinación conjunta de nabumetona (arriba) y de 6-MNA (abajo).

Como puede constatar, la interferencia más llamativa es la producida por el naproxeno, y se debe a que, en estas condiciones experimentales, el naproxeno da lugar a curvas de decaimiento relativamente intensas cuyos tiempos de vida, calculados mediante el algoritmo de Marquardt [247], son aproximadamente 10 ns, es decir, intermedios entre el tiempo de vida de la nabumetona y el del 6-MNA. La presencia del resto de compuestos ensayados da lugar a una señal de fondo que afecta principalmente a la determinación de nabumetona.

10. Aplicaciones del método propuesto

10.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas

No se encontraron medicamentos que contuvieran en su composición 6-MNA, puesto que éste es un metabolito que se forma en el organismo de forma natural al administrar al paciente nabumetona como profármaco. Se adquirieron en una farmacia local los comprimidos Relif (Meda Pharma S.A.U., San Fernando de Henares, Madrid; fabricado por Wülfig Pharma GmbH, Gronau, Alemania), cada uno de los cuales contiene un gramo de nabumetona como principio activo. Se pulverizó uno de estos comprimidos con la ayuda de un mortero y se disolvió en etanol del 96% mediante media hora de agitación a 30 °C y treinta minutos más en un baño de ultrasonidos. La disolución se filtró en un matraz aforado a través de un filtro para análisis cuantitativo DP 145 125 (Albet) y se enrasó a 500 mL con etanol, obteniéndose una disolución madre de 2000 mg L⁻¹, la cual se diluyó 1000 veces para preparar la disolución de partida para los análisis.

Se prepararon nueve muestras diferentes del medicamento siguiendo el procedimiento explicado, y, a continuación, se diluyeron, con el fin de que la concentración de nabumetona en las muestras problema fuera de 150,0 µg L⁻¹ (incluida en el intervalo lineal del método desarrollado). Además, a tres de las muestras se añadió una concentración baja de 6-MNA (50,0 µg L⁻¹) y a otras tres una concentración alta (150,0 µg L⁻¹) para estudiar si es posible la determinación simultánea de la nabumetona presente en el medicamento y del 6-MNA. Las nueve disoluciones se midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, y se predijo las concentraciones de los analitos en cada muestra mediante el método PLS desarrollado. Los resultados, expresados como porcentaje de recuperación medio de los tres replicados de cada muestra analizados se encuentran resumidos en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del análisis de muestras de la preparación farmacéutica Relif en ausencia y/o presencia de 6-MNA.

[Analito] nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)	
NABU	6-MNA	NABU	6-MNA	NABU	6-MNA	NABU	6-MNA
150,0	-	0	0	152,4	-	101,6	-
150,0	-	0	50,0	151,2	50,8	100,8	101,6
150,0	-	0	150,0	150,3	152,6	100,2	101,8

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el análisis de las disoluciones de Relif son en todos los casos próximos al 100%, lo cual indica que la concentración de analito medida concuerda totalmente con el contenido nominal en nabumetona de la preparación farmacéutica, cuyo principio activo puede, además, determinarse sin problemas en presencia de 6-MNA, tanto a bajas como a altas concentraciones. Así mismo, no se encontró interferencia alguna por parte de los excipientes que acompañan en el fármaco al principio activo.

10.2. Aplicación del método a muestras de orina humana

Puesto que la orina humana contiene compuestos que presentan fluorescencia a las longitudes de onda utilizadas en este trabajo para la determinación simultánea de nabumetona y 6-MNA [277] (véase la figura 26), se decidió desarrollar un método de calibración diferente para detectar y cuantificar en ella los analitos en estudio. Dicho método hizo uso de un diseño central compuesto para tres componentes (más un blanco analítico) en la matriz de calibración, de tal forma que la influencia de la orina quedara recogida en el desarrollo del modelo PLS-1. Cada una de las muestras sintéticas de esta matriz de calibración contenía una concentración de nabumetona comprendida entre 0 y 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, una concentración de 6-MNA entre 0 y 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, y una dilución de orina situada en el intervalo de 1/105 a 1/500, tal y como recoge la tabla 16. La figura 27 muestra, asimismo, un esquema de la matriz de calibración.

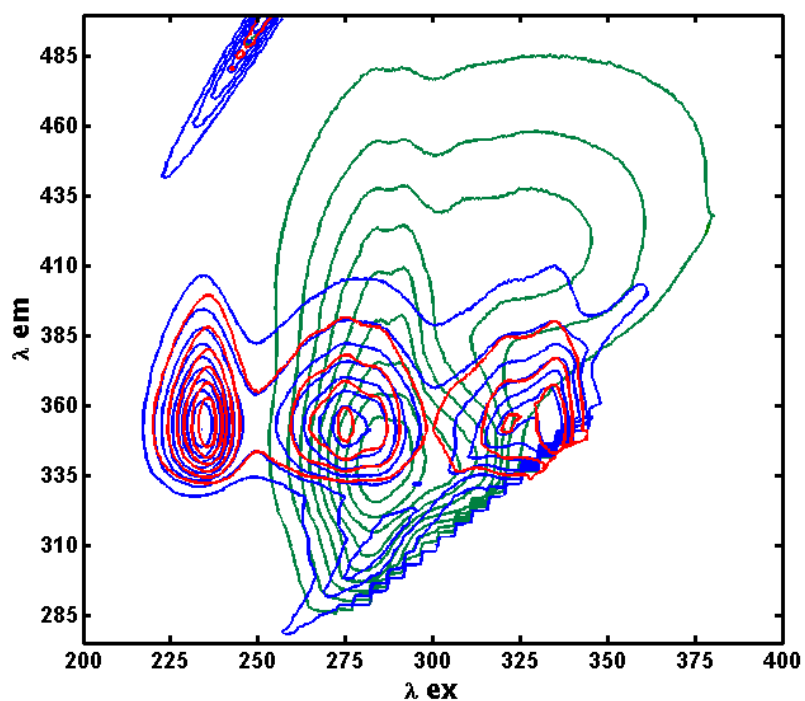


Figura 26. Fluorescencia total en forma de curvas de nivel para la nabumetona (rojo), el 6-MNA (azul) y la orina (verde).

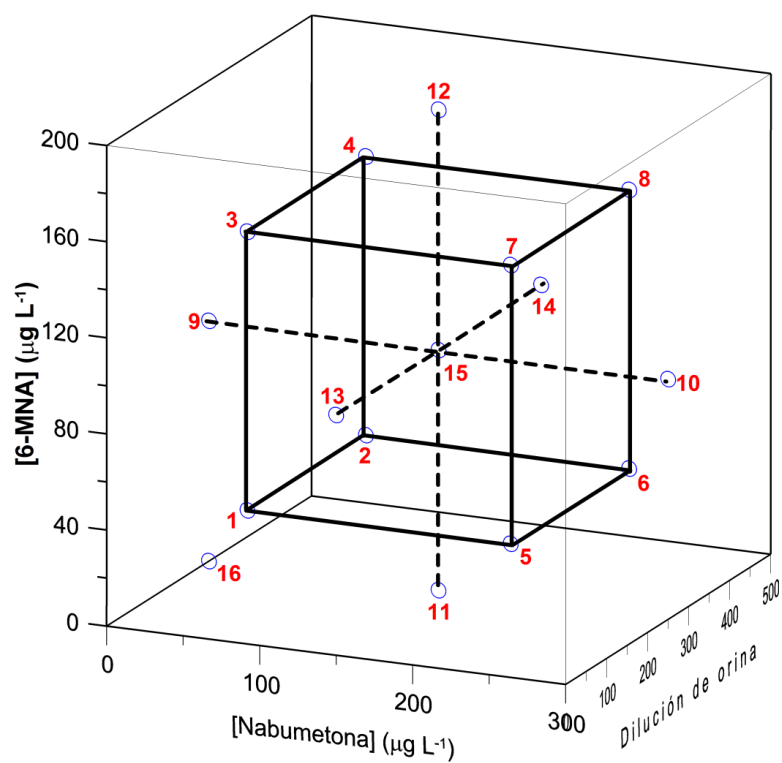


Figura 27. Representación gráfica del diseño central compuesto empleado en la matriz de calibración.

Tabla 16. Concentraciones de los analitos y diluciones de orina en cada punto de la matriz de calibración.

Muestra	[Nabumetona] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[6-MNA] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Orina (dilución)
1	64,0	42,0	105,0
2	64,0	42,0	394,0
3	64,0	158,0	105,0
4	64,0	158,0	394,0
5	236,0	42,0	105,0
6	236,0	42,0	394,0
7	236,0	158,0	105,0
8	236,0	158,0	394,0
9	0	100,0	250,0
10	300,0	100,0	250,0
11	150,0	0	250,0
12	150,0	200,0	250,0
13	150,0	100,0	0
14	150,0	100,0	500,0
15	150,0	100,0	250,0
16	0	0	250,0

Las muestras de esta matriz de calibración se analizaron utilizando las condiciones químicas e instrumentales óptimas. Se observó que los resultados obtenidos mejoraban aumentando el número de replicados del blanco que se incluía en el modelo. Por ello, el modelo contó finalmente con cuatro blancos analíticos. En la figura 28 se muestran las diecinueve curvas de decaimiento fluorescente que constituyen la matriz de calibración.

Todas las curvas se exportaron a archivos de texto y, haciendo uso de la subrutina MVC-1 de Matlab [252], se estudió el número de factores, los intervalos temporales a introducir y la posible presencia de puntos discrepantes, siguiendo los criterios explicados anteriormente [238] (determinación simultánea de nabumetona y 6-

MNA en ausencia de orina). Los resultados de todos estos estudios aparecen recogidos en las tablas 17 y 18.

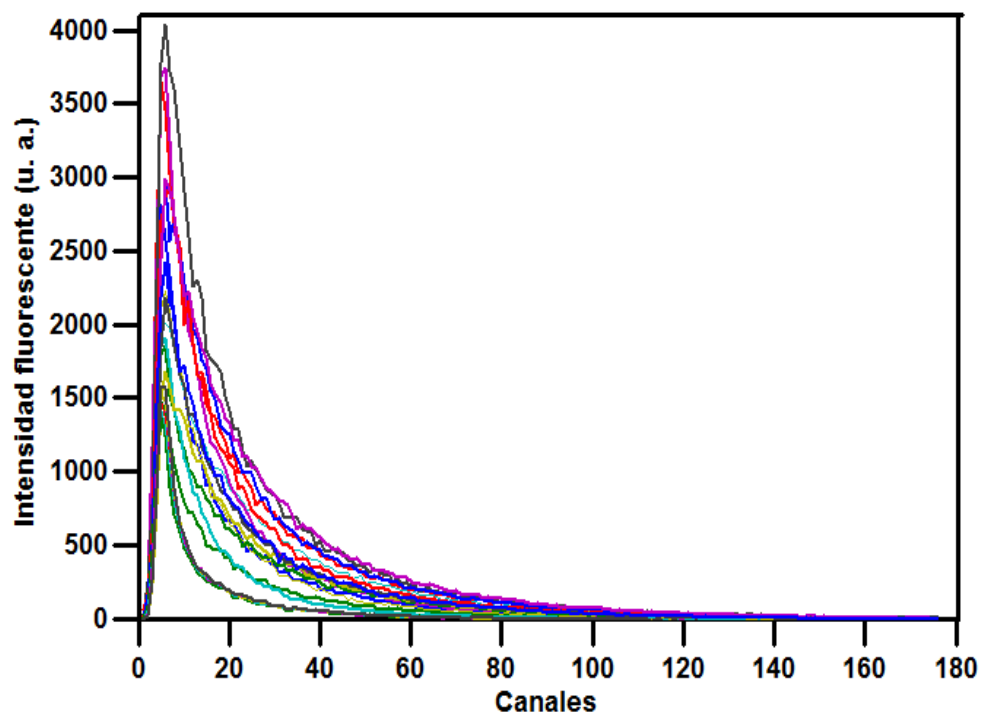


Figura 28. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

Tabla 17. Optimización del número de factores
(canales del 5 al 170 para la nabumetona y del 1 al 175 para el 6-MNA).

	Nabumetona			6-MNA		
Número de factores	PRESS	F	P	PRESS	F	P
0	197340	51,21	0,999	87454	157,79	0,999
1	100710	26,14	0,999	30281	54,63	0,999
2	61356	15,92	0,999	7526	13,58	0,999
3	12077	3,13	0,991	584	1,05	0,544
4	7138	1,85	0,905	554	1	0,499
5	4633	1,20	0,654	690	0	0
6	3853	1	0,499	687	0	0

Tabla 18. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R²
Nabumetona	5	15,61	13,14	0,97
6-MNA	3	2,11	1,83	0,997

Como muestran las tablas 17 y 18, el número óptimo de factores óptimo fue tres para el 6-MNA y cinco para la nabumetona. Los parámetros estadísticos son mucho mejores para el 6-MNA que para la nabumetona, lo cual indica que probablemente el método PLS no ha sido capaz de discernir completamente entre las contribuciones de la orina y de la nabumetona a las curvas de decaimiento de las muestras de la matriz de calibración. En ninguno de los casos se encontraron muestras discrepantes.

A continuación se puso a prueba la capacidad predictiva del método desarrollado, para lo cual se prepararon y midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas diez muestras que contenían concentraciones de los analitos aleatorias comprendidas dentro de los intervalos de calibración [253]. La dilución de orina fue 250,0 en todos los casos y las diez curvas registradas se muestran en la figura 29.

Se utilizó la matriz de calibración desarrollada previamente para calcular contenido en nabumetona y 6-MNA de cada una de las muestras de predicción, obteniéndose los resultados contenidos en las tablas 19 y 20.

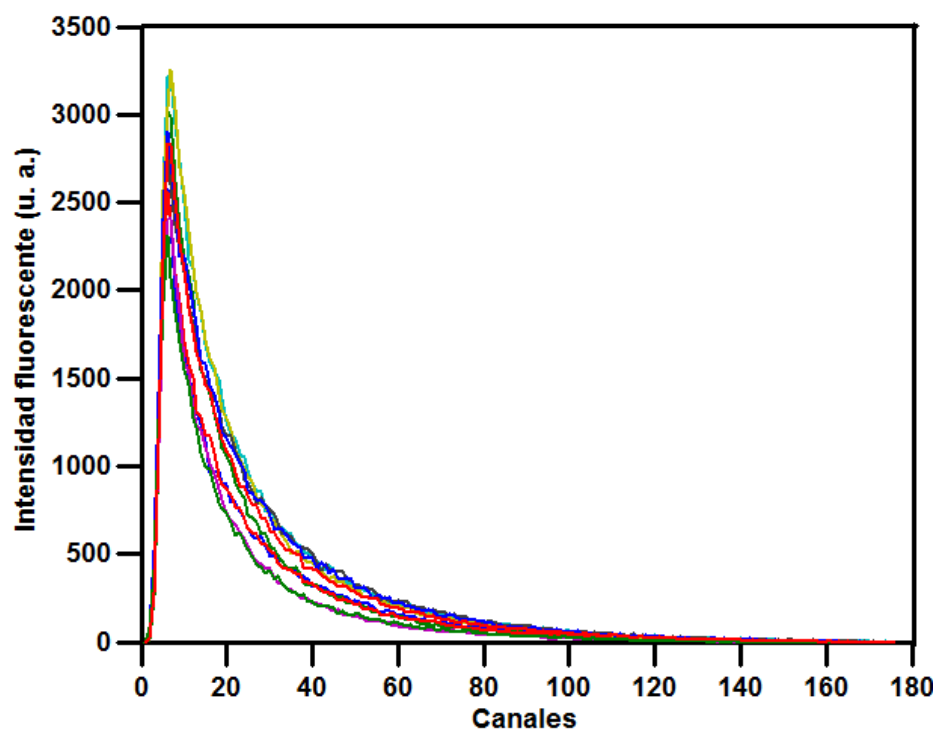


Figura 29. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

Tabla 19. Predicción del contenido en nabumetona de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	68,0	90,3	8,5	3,7	132,8
2	276,0	342,0	11	3,6	123,9
3	114,0	153,6	7,2	3,1	134,8
4	220,0	281,4	10	2,9	127,9
5	184,0	232,3	7,9	3,6	126,2
6	256,0	329,8	8,6	2,3	128,8
7	90,0	122,9	8,3	2,9	136,6
8	130,0	161,2	9,3	3,3	124,0
9	146,0	191,4	6,0	3,3	131,1
10	160,0	201,6	10	3,3	126,0

Tabla 20. Predicción del contenido en 6-MNA de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	s_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	104,0	104,9	3,2	6,3	100,9
2	76,0	79,5	4,1	4,5	104,6
3	94,0	97,3	2,8	4,9	103,5
4	148,0	149,6	3,5	3,7	101,1
5	50,0	49,8	2,9	4,1	99,6
6	134,0	132,3	3,4	2,9	98,7
7	184,0	182,7	2,6	3,4	99,3
8	166,0	167,7	2,6	3,4	101,0
9	64,0	62,6	1,9	3,3	97,7
10	130,0	132,0	3,3	4,4	101,5

En la figura 30 pueden verse las rectas obtenidas mediante mínimos cuadrados al ajustar los datos de concentraciones de los analitos que el modelo PLS-1 predice frente a las añadidas, y la figura 31 representa las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen de dichas rectas a un nivel de confianza del 95%.

Todos los datos muestran que los resultados en el análisis de 6-MNA fueron excelentes: recuperaciones muy próximas al 100% en todos los casos y una recta de concentraciones calculadas frente a concentraciones añadidas con un coeficiente de la determinación de 0,998 y una pendiente y una ordenada en el origen indistinguibles de 1 y 0, respectivamente, a un nivel de confianza del 95% [275].

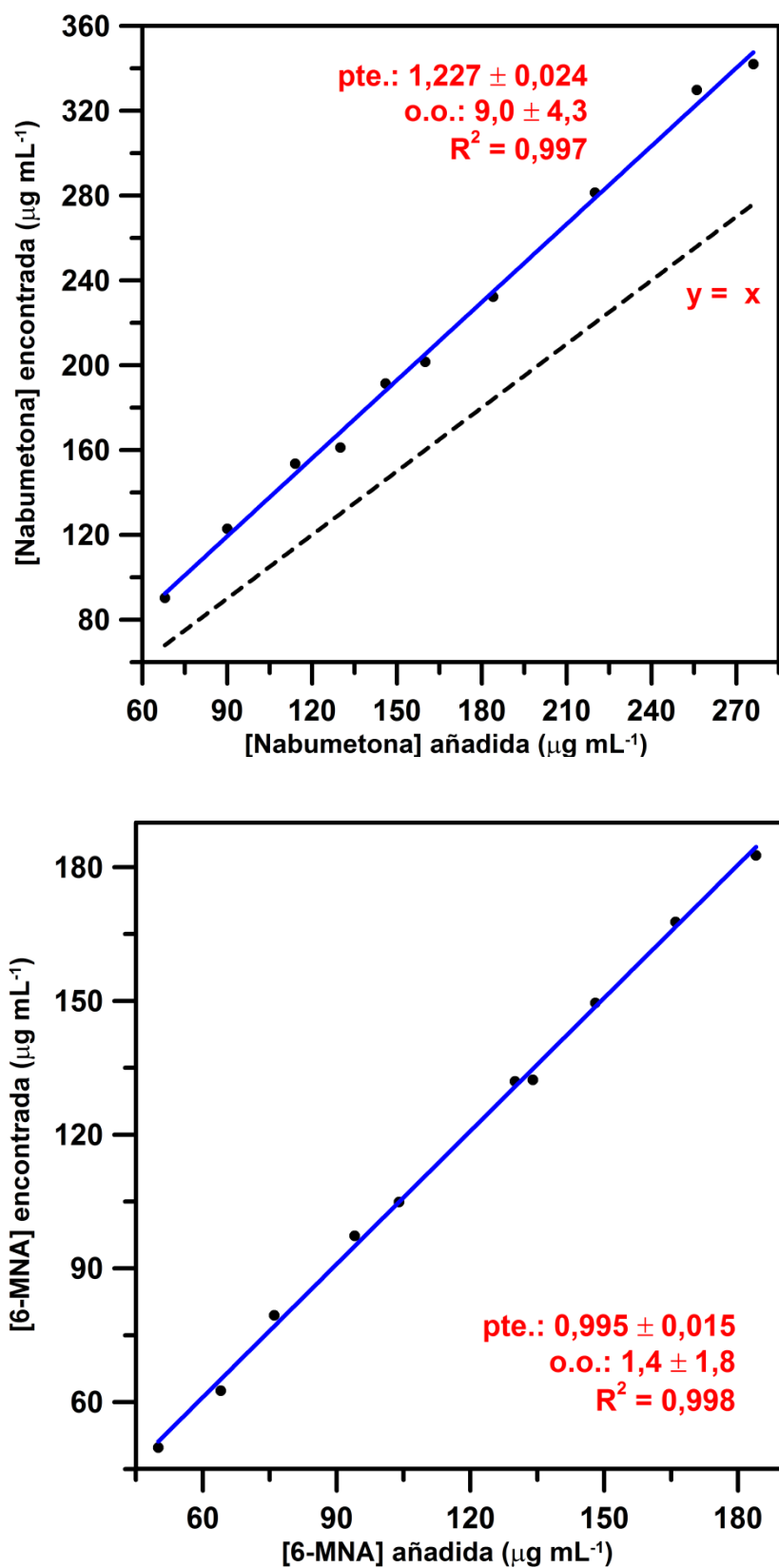


Figura 30. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para la nabumetona (arriba) y para el 6-MNA (abajo) en orina, y ajustes a rectas mediante mínimos cuadrados.

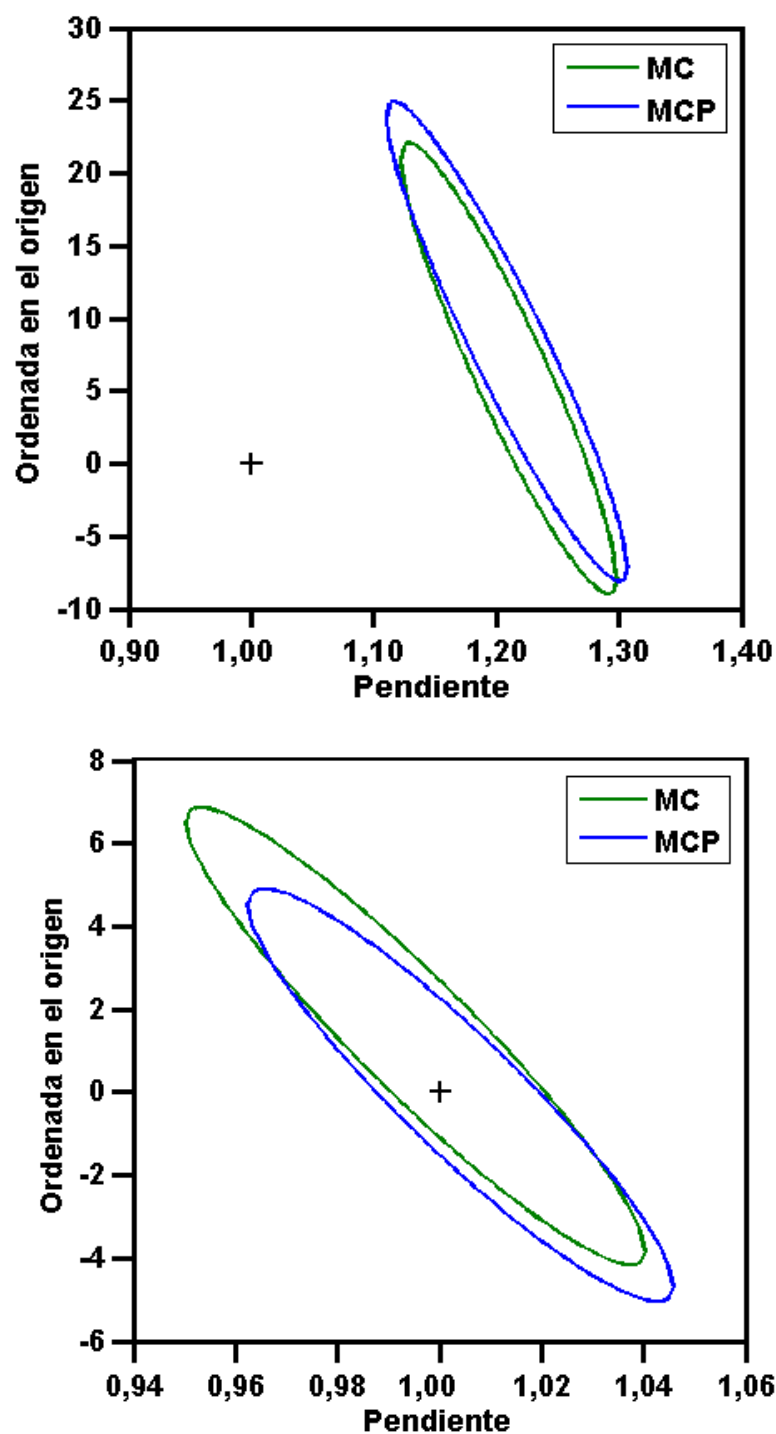


Figura 31. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para la nabumetona (arriba) y el 6-MNA (abajo) en orina, considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (azul).

Sin embargo, los resultados en la predicción de las concentraciones de nabumetona en las muestras de validación fueron muy pobres, ya que los porcentajes de recuperación están situados entre el 124,0 y el 136,6 %. Debido a ello, en ningún caso las concentraciones predichas son estadísticamente indistinguibles de las añadidas (los datos están muy alejados de la recta $y = x$, y el punto (1, 0) se encuentra en este caso fuera de la elipse) [275]. No obstante, dichas concentraciones sí se ajustan perfectamente ($R^2 = 0,997$) a la recta $y = (1,227 \pm 0,024) x + (9,0 \pm 4,3)$, tal y como muestra la figura 29. En consecuencia, se pensó que esta recta podría utilizarse como método de predicción si se diera el caso de que fuera siempre la misma con independencia del origen de la orina, tal y como ocurrió en las determinaciones simultáneas de los complejos entre los fenamatos y el terbio.

Tras los análisis pertinentes, se concluyó que, si bien las concentraciones predichas y añadidas se ajustan siempre a una recta en presencia de una dilución constante de orina, en la determinación simultánea de nabumetona y 6-MNA por el método propuesto la ecuación de esta recta es totalmente dependiente de cuál sea la orina, a diferencia de lo que ocurría en los análisis de fenamatos.

Este hecho se debe a que en el caso de la determinación de los complejos fenamatos-terbio la orina originaba únicamente una señal de fondo aleatoria, independiente de su composición, puesto que a las longitudes de onda utilizadas la orina no presenta fluorescencia nativa. En el caso de la determinación de nabumetona y 6-MNA, sin embargo, se utilizan longitudes de onda de excitación y emisión muy cercanas a uno de los picos de fluorescencia de la orina [277], como mostraba la figura 26, de tal manera que en estos análisis la orina sí presenta fluorescencia, la cual es más o menos intensa dependiendo de cuál sea en ella la concentración de los compuestos fluorescentes. Este hecho explica que los resultados obtenidos sean diferentes para cada una de las orinas ensayadas.

Además, la curva de decaimiento de una muestra de orina se encuentra mucho más cercana a la de la nabumetona que a la de 6-MNA, tal y como puede observarse en la figura 32. De hecho, el tiempo de vida calculado para la orina usando el algoritmo de Marquardt [247] fue de aproximadamente 5 ns, mucho más cercano al de la nabumetona

que al del 6-MNA. Esto justifica que el modelo PLS sí sea capaz de distinguir perfectamente entre la señal debida a la orina y la debida al 6-MNA, pero no consiga discriminar al 100% la señal procedente de la nabumetona y la fluorescencia de la orina, de tal manera que parte de la señal debida a la orina se interpreta como señal correspondiente a la nabumetona. En consecuencia, siempre se obtiene un error por exceso en la determinación de nabumetona, mientras que la orina no afecta en ningún caso a la determinación de 6-MNA, ya que las concentraciones predichas para este metabolito en las tres orinas presentan, en general, sólo pequeñas oscilaciones (véase la tabla 22).

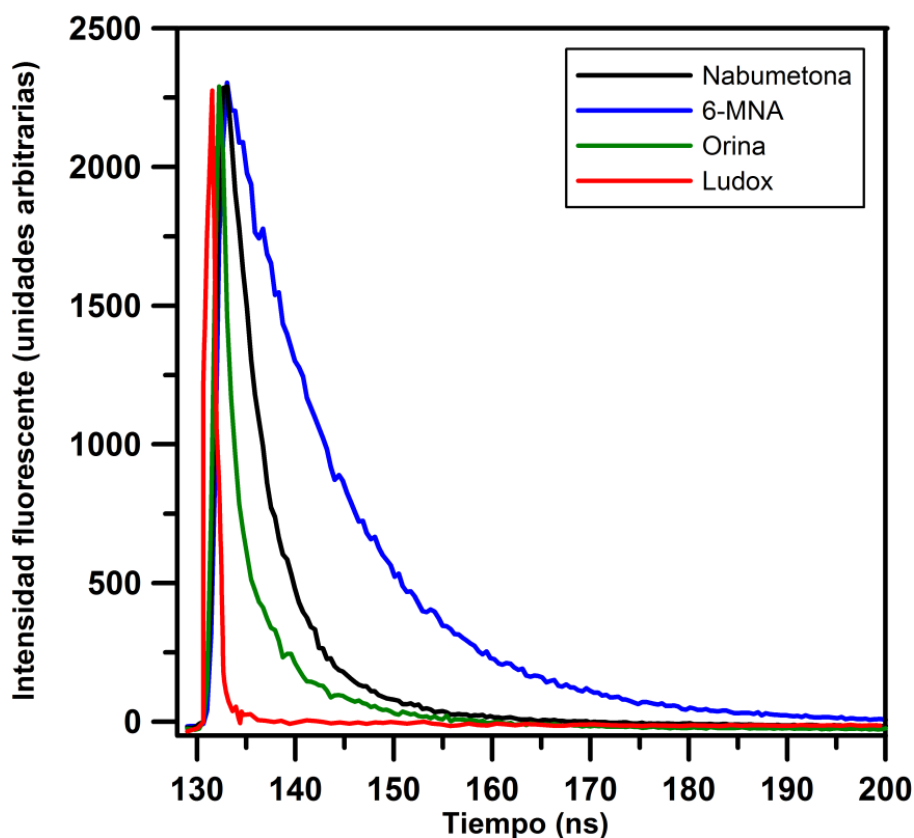


Figura 34. Curvas de decaimiento normalizadas para la nabumetona ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$), el 6-MNA ($150 \mu\text{g L}^{-1}$) y la orina (250 diluciones). pH 8,0; 80% v/v EtOH; $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 353 \text{ nm}$. Se representa también la señal procedente de la fuente de excitación.

Puesto que, con independencia de cuál sea el origen de la orina, siempre se obtiene una línea recta al representar las concentraciones predichas frente a las añadidas

(a una dilución de orina constante), se decidió abordar la determinación de nabumetona mediante el método de las adiciones estándar. Se tomó la orina de tres personas a las que no se había administrado ningún tipo de medicamento y se prepararon tres series de muestras, cada una de las cuales contenía una concentración conocida de nabumetona ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) y cantidades crecientes de dicho analito, en presencia de diferentes concentraciones de 6-MNA y 250,0 diluciones de orina. Los resultados se muestran en las tablas 21 y 22, así como en la figura 33.

Tabla 21. Resultados del contenido en nabumetona de muestras sintéticas de orina.

Muestra	[Añadida] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	100,0+14,0	153,6	82,9	102,6
2	100,0+60,0	201,6	119,2	149,6
3	100,0+84,0	232,3	134,0	173,3
4	100,0+120,0	281,4	160,7	196,9
5	100,0+160,0	329,8	186,7	235,9

Tabla 22. Resultados del contenido en 6-MNA de muestras sintéticas de orina.

Muestra	[Añadida] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Predicha] en la orina 3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	94,0	97,4	101,9	95,3
2	130,0	132,0	132,0	142,6
3	50,0	49,8	51,9	54,4
4	148,0	149,6	160,7	159,8
5	134,0	132,3	140,2	144,0

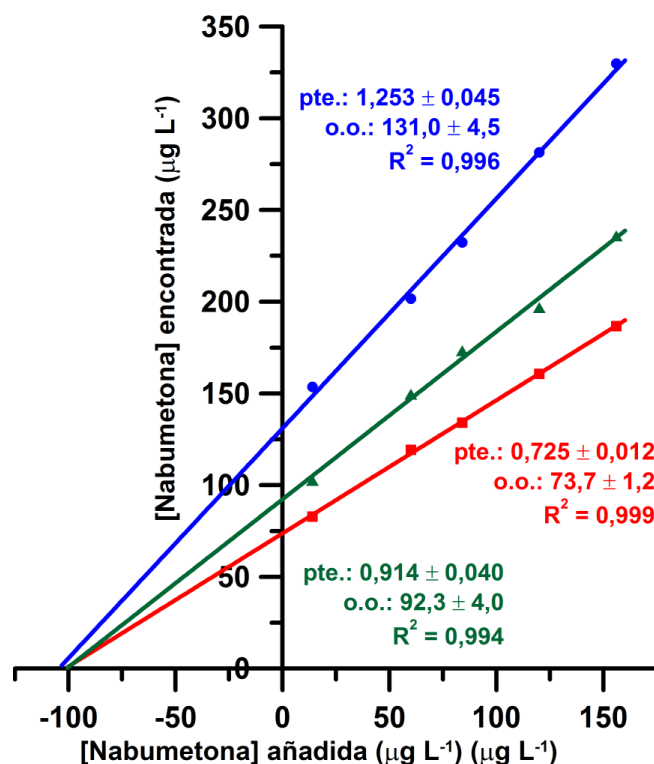


Figura 33. Determinación de nabumetona por el método de las adiciones estándar en la orina 1 (azul), la orina 2 (rojo) y la orina 3 (verde). Ajuste por mínimos cuadrados.

Por último, en la tabla 23 puede verse que mediante el método de las adiciones estándar en los tres casos se obtuvo concentraciones de nabumetona cercanas a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, que es la concentración problema. En conclusión, el método da lugar a resultados satisfactorios en la determinación de nabumetona en orina.

Tabla 23. Concentración problema de nabumetona calculada por el método de las adiciones estándar, y porcentajes de recuperación.

Muestra	[Nabumetona] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
1	104,8	104,8
2	102,4	102,4
3	101,4	101,4
Media	$102,9 \pm 1,4$	$102,9 \pm 1,4$

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN DE DOS METABOLITOS PRINCIPALES DE LA ASPIRINA POR FLUORESCENCIA RESUELTA EN EL TIEMPO

Abstract

The simultaneous determination of two major metabolites of acetyl salicylic acid - salicylic and gentisic acids - in pharmaceutical preparations and human urine is achieved in this chapter. The method makes use of fluorescence decay curves to resolve the mixture of the analytes, since these curves are more selective than the strongly overlapped fluorescence spectra. A simplex optimization procedure was selected for the optimization of dependent instrumental variables affecting the signal-to-noise ratio. A factorial design with three levels per factor coupled to a central composite design was chosen to obtain a calibration matrix of thirteen standards plus two blank samples that was processed using a partial least-squares (PLS) analysis. The method was validated by predicting nine synthetic samples, obtaining recovery percentages between 95 and 106 % in all cases, with $3.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1.66 \mu\text{g L}^{-1}$ as limits of detection for salicylic and gentisic acids, respectively. The method was tested in three pharmaceutical preparations that contains salicylic acid, obtaining recovery percentages close to 100%. Finally, the simultaneous determination of both analytes in human urine samples was successfully carried out by the PLS-analysis of a matrix of thirteen standards plus five analyte blanks. Recoveries in ten spiked samples were between 94 and 105%. No extraction method neither prior separation of the analytes were needed.

1. Generalidades

Las figuras 1 y 2 muestran las estructuras químicas del ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) y del ácido genticónico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), respectivamente.

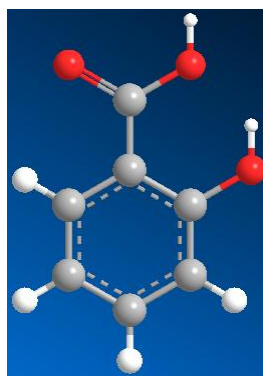
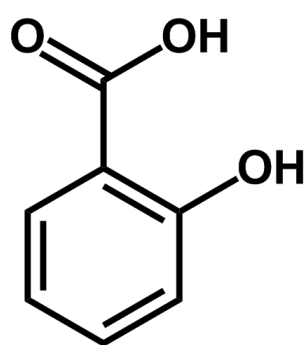


Figura 1. Estructura química en dos y tres dimensiones del ácido salicílico.

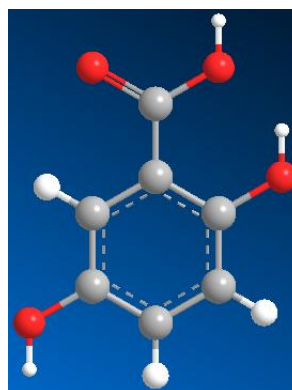
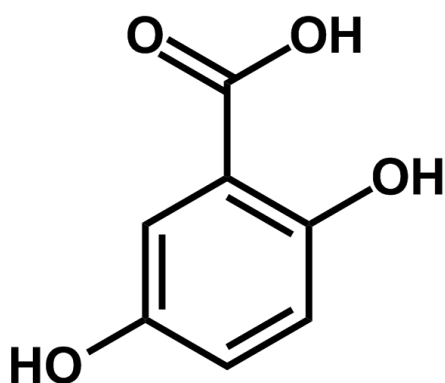


Figura 2. Estructura química en dos y tres dimensiones del ácido genticónico.

La aspirina, o ácido acetilsalicílico, tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas

por parte de su metabolito activo, el ácido salicílico. También produce un efecto antiagregante plaquetario, el cual se debe a su capacidad como donante del grupo acetilo a la membrana plaquetaria. La absorción es rápida y completa tras la administración oral, siendo la vida media de la molécula intacta sólo de entre quince y veinte minutos, puesto que se hidroliza rápidamente a salicilato. Se elimina por vía renal como ácido salicílico libre y otros metabolitos (principalmente, ácido salicilúrico y ácido gentísico).

Además, el ácido salicílico tópico tiene propiedades queratolíticas, por lo que es ampliamente utilizado para tratar enfermedades de la piel que se caracterizan por descamación o crecimiento excesivo de las células cutáneas, como psoriasis, ictiosis, caspa, callos, durezas y verrugas en las manos o los pies. Actúa suavizando la piel seca, escamosa o engrosada, facilitando su desprendimiento o eliminación. Sin embargo, no está indicado para el tratamiento de verrugas genitales, verrugas faciales, verrugas pilosas, verrugas en la nariz o la boca, lunares o marcas de nacimiento. El ácido salicílico tópico también se utiliza para prevenir la aparición o incluso eliminar espinillas y acné, ya que permite la apertura de los poros de la piel obstruidos.

Numerosos son los métodos para determinar simultáneamente los ácidos salicílico y gentísico mediante **cromatografía líquida**, en matrices tan diversas como plasma [365-380], líquido sinovial [380], orina [366-371, 374-376, 381-386], heces [367, 376], tejidos biológicos [367, 368, 373, 376], células [387], hongos *Penicillium* [388], propóleos [389], soja [390, 391], cereales [392, 393], patatas [394], plantas [395-398], hierbas medicinales [399], bayas y frutas [400-403], bebidas alcohólicas [398, 404-406], zumo de pomelo y té verde [406] y preparaciones farmacéuticas [407].

Diversas técnicas basadas en la **cromatografía de gases** se han usado para determinar ácidos salicílico y gentísico en orina [408], alimentos [409], bayas [410], zumo de cereza [411] y plantas [412-417].

Técnicas de **cromatografía en capa fina** también han tenido éxito a la hora de separar ácidos salicílico y gentísico y compuestos similares [418] en vino [419].

Mediante **electroforesis capilar**, estos analitos se han podido separar y determinar con éxito [420-422] en células y tejidos biológicos [423], cítricos [424], plantas [425] y orina [426]. Este último método utiliza detección fluorescente inducida por láser y posee límites de detección de 0,1 y 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para el ácido salicílico y el ácido gentísico, respectivamente.

Existen también varios métodos de determinación simultánea sin separación previa, todos ellos basados en la medida de la **fluorescencia** de los compuestos:

- Salinas y col. propusieron en 1990 [427] un método basado en fluorescencia sincrónica de derivadas. Los espectros de mezclas de ácidos salicílico y gentísico se registraron entre 225 y 465 nm (excitación) y 340 y 580 nm (emisión). Se determinó ácido salicílico a partir de las intensidades a 274/389 nm (excitación/emisión) y ácido gentísico a partir de las intensidades a 340/580 nm (excitación/emisión). Las concentraciones de los analitos se variaron entre 0,02 y 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y, tras extracción con éter etílico en medio ácido, las recuperaciones en orina estuvieron comprendidas entre el 88 y el 120%. Con la misma técnica, estos autores también resolvieron la mezcla ácido salicílico – ácido salicílico.

En 1995 Damiani y col. [428] pudieron resolver la mezcla ternaria de estos tres metabolitos de la aspirina en orina utilizando la misma técnica.

- En 1992, Konstantianos y col. [429] utilizaron también la fluorescencia sincrónica y derivadas de segundo orden, para resolver mezclas binarias, ternarias y cuaternarias (ácidos acetil salicílico, salicílico, gentísico y salicílico) en suero, tras una extracción con cloroformo y ácido acético. Las recuperaciones oscilaron entre el 93 y el 107%.
- Murillo y Alañón resolvieron en 1994 [430] la mezcla ácido salicílico – ácido gentísico mediante fluorescencia sincrónica por isopotenciales de la matriz, obteniendo resultados altamente reproducibles.

Dos años más tarde, estos mismos autores hicieron uso de la fluorescencia sincrónica de ángulo variable combinada con derivadas para resolver la mezcla ternaria ácido salicílico - ácido gentísico - ácido p-aminobenzoico [431].

- En 1995, Muñoz de la Peña y col. [432] registraron los espectros tridimensionales de fluorescencia de mezclas de los ácidos salicílico, salicilúrico y gentísico, y utilizaron calibración multivariante para resolverlas. Observaron que los espectros de excitación (279,8 - 360,8 nm; emisión a 420,0 nm) eran más adecuados para determinar los ácidos salicílico y salicilúrico, mientras que los espectros de emisión (373,4 – 500,0 nm; excitación a 310,0 nm) eran más ventajosos en la determinación del ácido gentísico. Obtuvieron resultados similares mediante PLS y PCR.

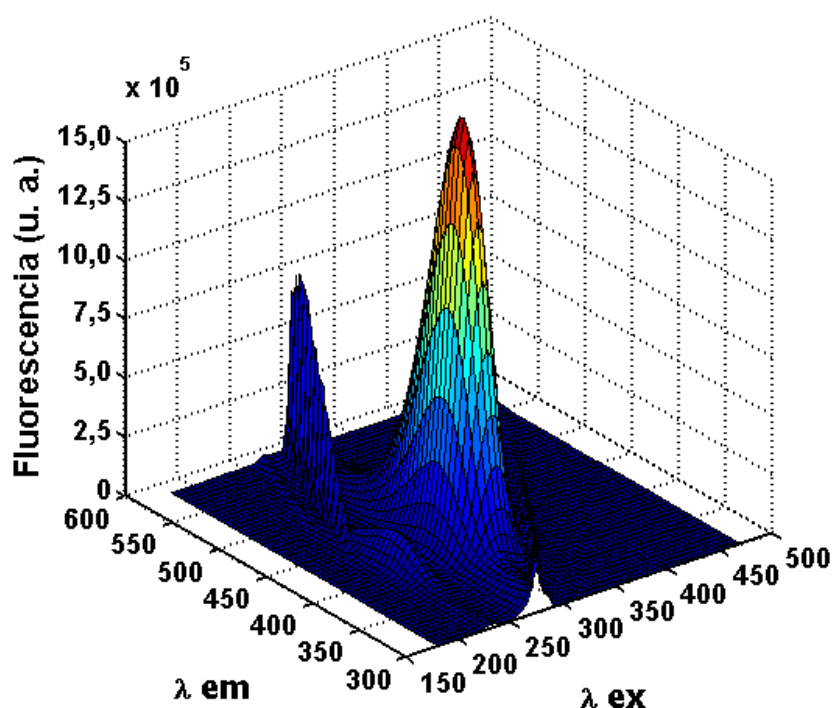
Estos mismos autores publicaron en el mismo año otro estudio [433] en el cual llevaron a cabo la determinación simultánea de ácido salicílico, ácido o-hidroxihipúrico y ácido gentísico mediante registro de los espectros tridimensionales de fluorescencia de las mezclas y calibración multivariante (PLS). Las recuperaciones oscilaron entre el 89,9 y el 110%.

- Esteves da Silva y Novais [434] desarrollaron en 1998 un método basado en la descomposición mediante calibración multivariante (PARAFAC) de espectros de fluorescencia sincrónica a diferentes pH de mezclas de ácidos salicílico, gentísico y salicilúrico.
- Métodos multivariantes de descomposición trilineal usaron también Wu y col. [435] para determinar simultáneamente los ácidos salicílico y gentísico, con límites de detección de 822 y 945 pg mL⁻¹, respectivamente. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre el 97,2 y el 101,2%.

- Por último, en 2003 Huang y col. [436] desarrollaron un nuevo algoritmo de calibración (“Parallel Factor Analysis with Penalty Diagonalization Error”) y lo aplicaron a espectros tridimensionales de fluorescencia para la resolución de la mezcla ácido salicílico – ácido géntísico – ácido p-aminobenzoico.

2. Características espectrales de los analitos y estudio de sus curvas de decaimiento

Las figuras 3 y 4 muestran los espectros de fluorescencia total, tanto del ácido salicílico como del ácido géntísico ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito; pH 5,5). Como puede observarse, los espectros de los analitos tienen la misma forma. Sin embargo, se hallan desplazados ligeramente uno con respecto al otro. Los máximos del ácido salicílico aparecen a $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$, y los del ácido géntísico a $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$. En consecuencia, la determinación simultánea mediante fluorescencia convencional resulta muy complicada, debido al fuerte solapamiento entre ambos espectros.



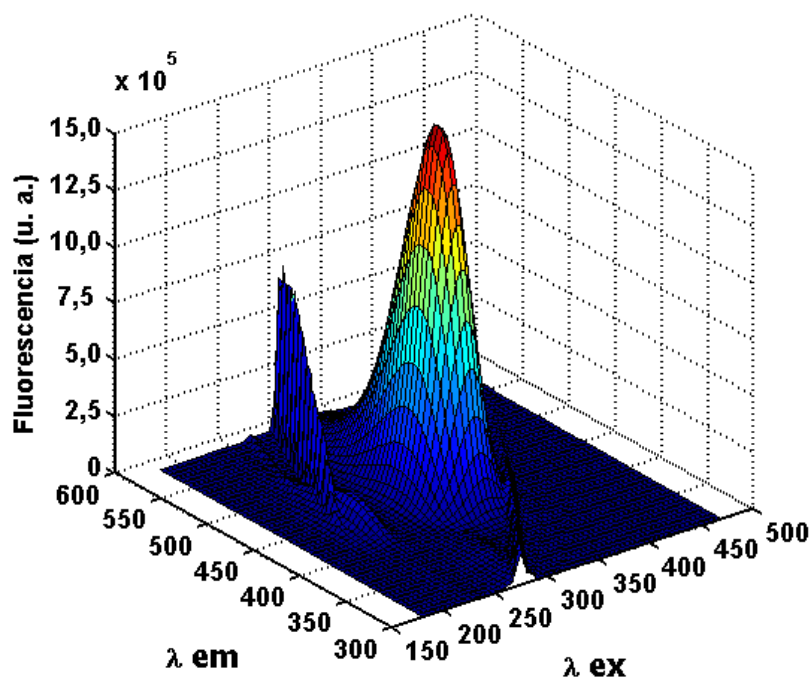


Figura 3. Espectros tridimensionales de fluorescencia del ácido salicílico(arriba) y del ácido gálico (abajo).

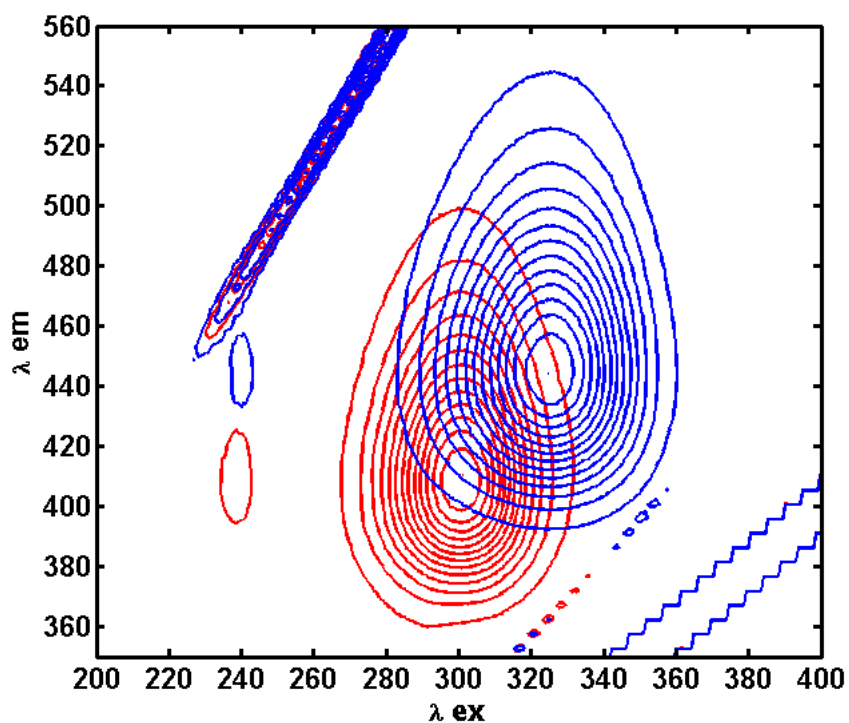


Figura 4. Curvas de nivel que muestran la fluorescencia total del ácido salicílico (en rojo) y del ácido gálico (en azul).

También se estudiaron las curvas de decaimiento fluorescente de los ácidos salicílico y gentísico, tal y como muestra la figura 5 ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de analito; pH 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 428 \text{ nm}$). Su análisis mediante el algoritmo de Marquardt [247], contenido en el software Felix32, dio lugar a los tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad contenidos en la tabla 1, así como a las curvas de ajuste de la figura 6.

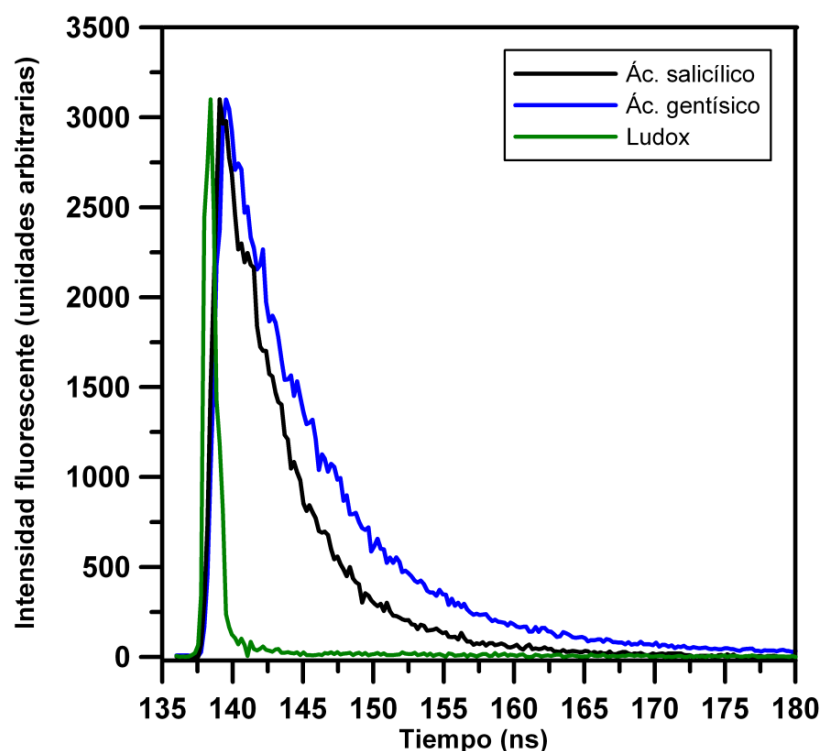


Figura 5. Curvas de decaimiento fluorescente normalizadas del ácido salicílico (en negro) y del ácido gentísico (en azul). Se empleó también una disolución dispersante para registrar la señal debida a la fuente de excitación (en verde).

Tabla 1. Tiempos de vida y parámetros estadísticos de calidad para el ácido salicílico y el ácido gentísico.

Parámetro	Ác. salicílico	Ác. Gentísico
χ^2	1,09	0,98
DW	1,71	1,82
Preexponencial	6011 ± 202	4991 ± 88
Tiempo de vida (ns)	$4,702 \pm 0,061$	$6,771 \pm 0,053$

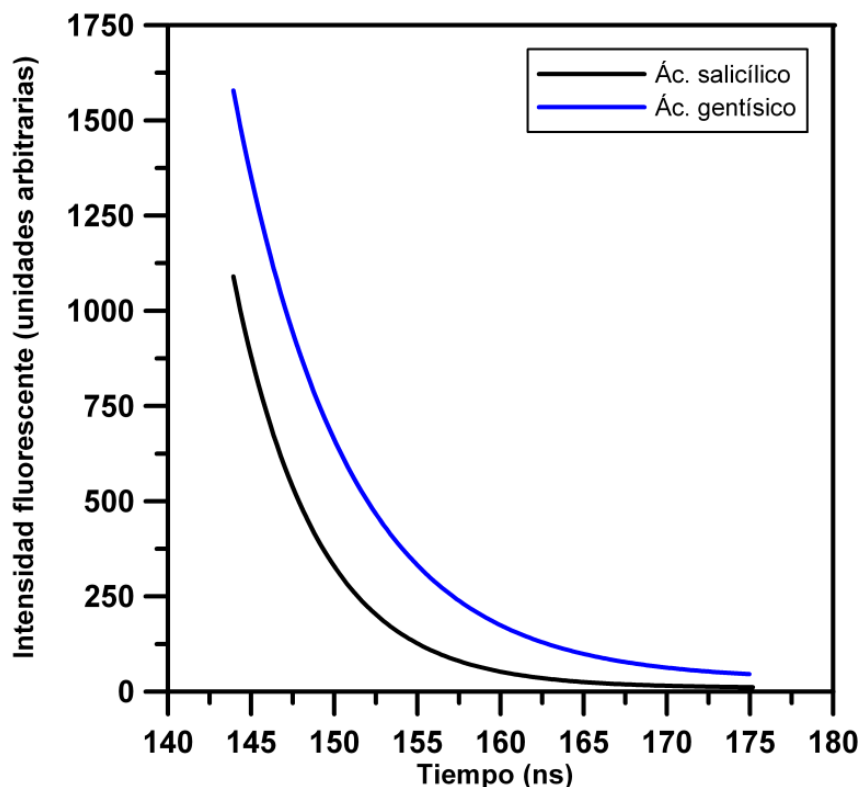


Figura 6. Ajustes obtenidos para las curvas de decaimiento del ácido salicílico (negro) y del ácido gentísico (azul).

Como el parámetro χ^2 se encuentra entre 0,8 y 1,3 y los valores del parámetro de Durbin-Watson (DW) son superiores a 1,7, los parámetros estadísticos de calidad muestran que en los dos casos los ajustes son satisfactorios. Además, la distribución tanto de la función de autocorrelación como de los residuales fue en ambos casos aleatoria alrededor del cero.

Como indica la tabla 1, los tiempos de vida medios calculados son aproximadamente 4,7 ns para el ácido salicílico y 6,8 ns para el ácido gentísico. La experiencia adquirida en este tipo de análisis indica que la diferencia entre las curvas de decaimiento de ambos analitos es suficiente para resolver con éxito mezclas entre ellos utilizando calibración multivariante.

La excitación se llevó a cabo utilizando el láser de nitrógeno. Como longitud de onda de excitación se escogió 305 nm, puesto que, en primer lugar se corresponde con

el máximo de emisión del colorante PLD-609 (que contiene rodamina B), usado para modificar la longitud de onda incidente del láser (que es 337 nm), y, en segundo lugar, es aproximadamente el valor intermedio entre los máximos de excitación de ambos analitos (véase la figura 7), de tal manera que no se favorece especialmente la señal de un analito con respecto a la del otro.

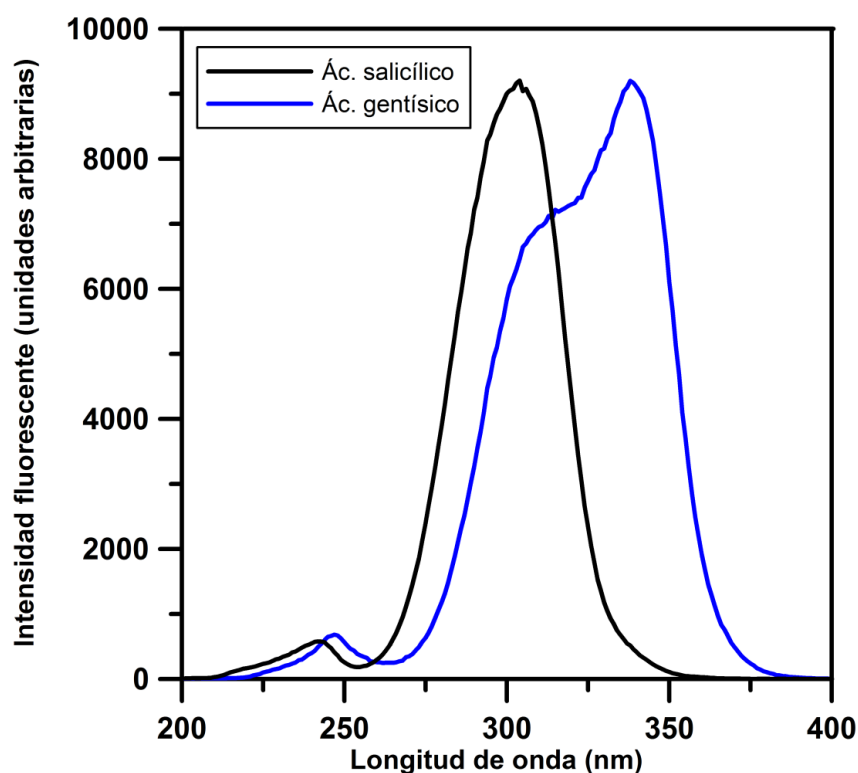


Figura 7. Espectros bidimensionales de excitación normalizados para el ácido salicílico (en negro, $\lambda_{em}=410$ nm) y para el ácido gentísico (en azul, $\lambda_{em}=445$ nm), pH 5,5.

Siguiendo el mismo criterio, se eligió como longitud de onda de emisión 428 nm, ya que éste es el valor medio de los máximos de emisión de ambos compuestos, y a él las intensidades de fluorescencia son aproximadamente iguales, tal y como se ilustra en la figura 8.

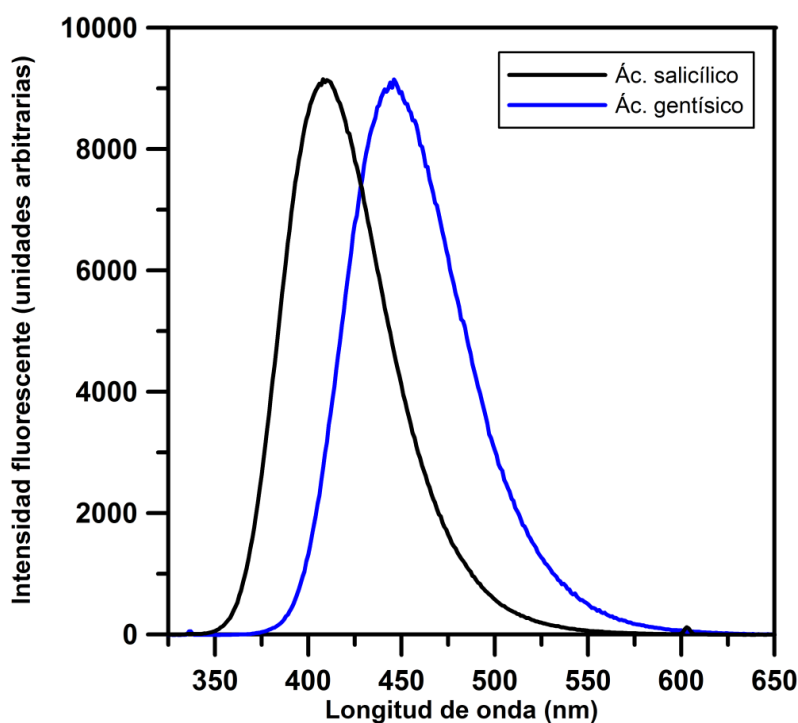


Figura 8. Espectros bidimensionales de emisión normalizados ($\lambda_{exc}=305$ nm, pH 5,5) para el ácido salicílico (en negro) y para el ácido genticóico (en azul).

3. Estabilidad de las disoluciones

Los ácidos salicílico y genticóico se disolvieron en NaOH 0,01 mol L⁻¹ para preparar disoluciones madre de 50,0 mg L⁻¹. Dichas disoluciones se conservaron a 4°C y en la oscuridad, y su estabilidad se estudió diariamente durante veintitrés días mediante la medida de los máximos de fluorescencia de cada analito, sin obtener variaciones significativas. El mismo procedimiento se utilizó para medir la estabilidad de disoluciones de trabajo de 500,0 µg L⁻¹ cada 15 minutos, obteniéndose resultados estadísticamente indiferenciables durante al menos dos horas.

4. Optimización de variables

Como es habitual, en primer lugar se optimizaron las variables químicas e instrumentales que influyen en el registro de las curvas de decaimiento luminiscente de los ácidos salicílico y gentísico. En todos los casos se utilizó una concentración de $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambos analitos.

4.1. Optimización secuencial de variables químicas

4.1.1. Selección del pH óptimo y de la naturaleza y la concentración del tampón

Se utilizaron disoluciones de HCl y NaOH para variar el pH de las disoluciones de trabajo entre 2 y 11, y así estudiar su influencia en la señal luminiscente. Como queda reflejado en la figura 9, a pH ácido la fluorescencia es baja para ambos compuestos, aumentando enormemente hasta aproximadamente pH 5. A partir de este valor, la intensidad de fluorescencia del ácido salicílico se mantiene constante, e incluso aumenta un poco más a pH básico. Para el caso del ácido gentísico, el valor máximo de intensidad se obtiene en un intervalo de pH más estrecho, disminuyendo enormemente a pH superiores a 9.

Por otra parte, se comprobó que el pH no afecta significativamente a la forma de las curvas de decaimiento fluorescente del ácido salicílico, y sólo se produce una disminución del tiempo de vida del ácido gentísico a los valores más extremos, cuando su cálculo no resulta fiable debido a la baja intensidad medida.

Se eligió 5,5 como pH óptimo, puesto que a este valor se obtiene la máxima fluorescencia para el ácido gentísico, y además se encuentra situado en la meseta del ácido salicílico.

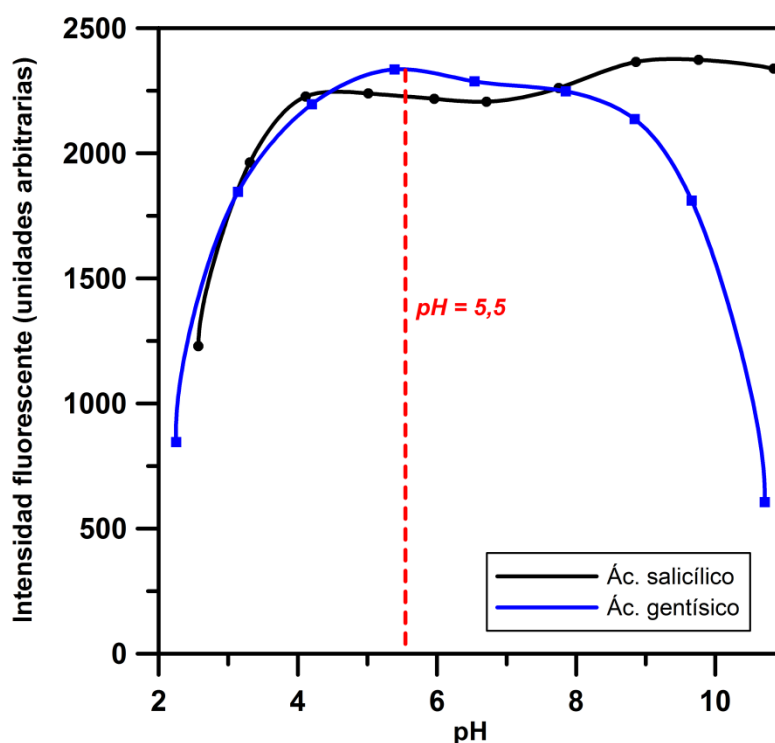


Figura 9. Influencia del pH en la fluorescencia de los ácidos salicílico y gentísico.

Para mantener constante el pH escogido como óptimo se utilizó el tampón ácido acético/acetato ($pK_a = 4,76$) a una concentración de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, ya que a concentraciones inferiores la capacidad reguladora del pH podría verse comprometida en aplicaciones del método, y a pH superiores se producía una disminución en la intensidad fluorescente del ácido gentísico, tal y como muestra la figura 10.

Los tiempos de vida calculados fueron constantes para el ácido salicílico e iban disminuyendo para el ácido gentísico a medida que aumentaba la concentración de tampón y disminuía su intensidad máxima de fluorescencia. Este hecho justifica también la elección de una concentración de tampón lo más baja posible, ya que para el desarrollo del método aquí propuesto las curvas de decaimiento de los analitos deben ser suficientemente diferentes.

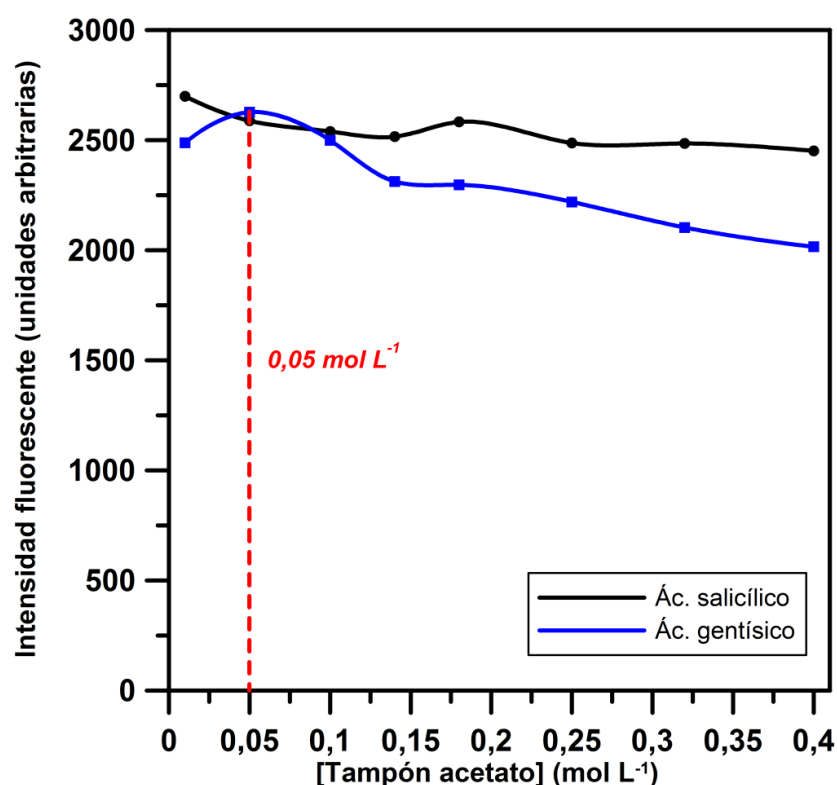


Figura 10. Influencia de la concentración de tampón acetato en la fluorescencia de los ácidos salicílico y genticóico.

4.1.2. Influencia de la temperatura

La figura 11 muestra empíricamente que la intensidad fluorescente disminuye a medida que aumenta la temperatura, lo cual está justificado teóricamente, ya que cuanto mayor es la temperatura más favorecidos se encuentran los procesos de desactivación no radiante frente a los de desactivación radiante.

Una vez más se decidió trabajar a 20°C, puesto que ésta es una temperatura próxima a la ambiente y, por tanto, fácil y rápida de termostatar.

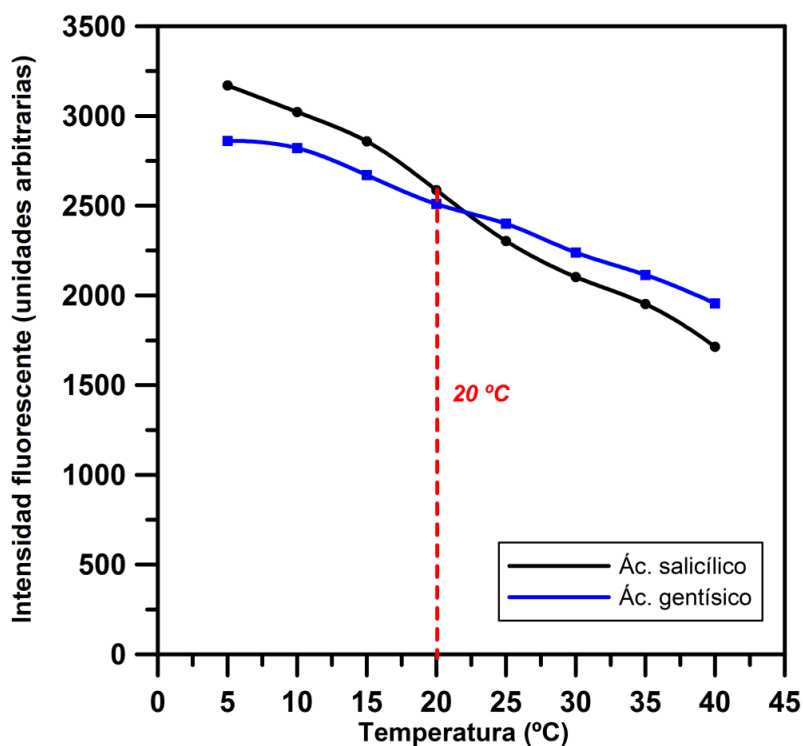


Figura 11. Influencia de la temperatura en la fluorescencia de los ácidos salicílico y gentísico.

4.2. Optimización de variables instrumentales

Durante este proceso de optimización se utilizaron los valores seleccionados previamente para las variables químicas en el registro de las curvas de decaimiento fluorescente entre 134 y 175 ns y a $\lambda_{\text{exc}} = 305$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 428$ nm. En la tabla 2 se indican los valores iniciales escogidos para las variables instrumentales.

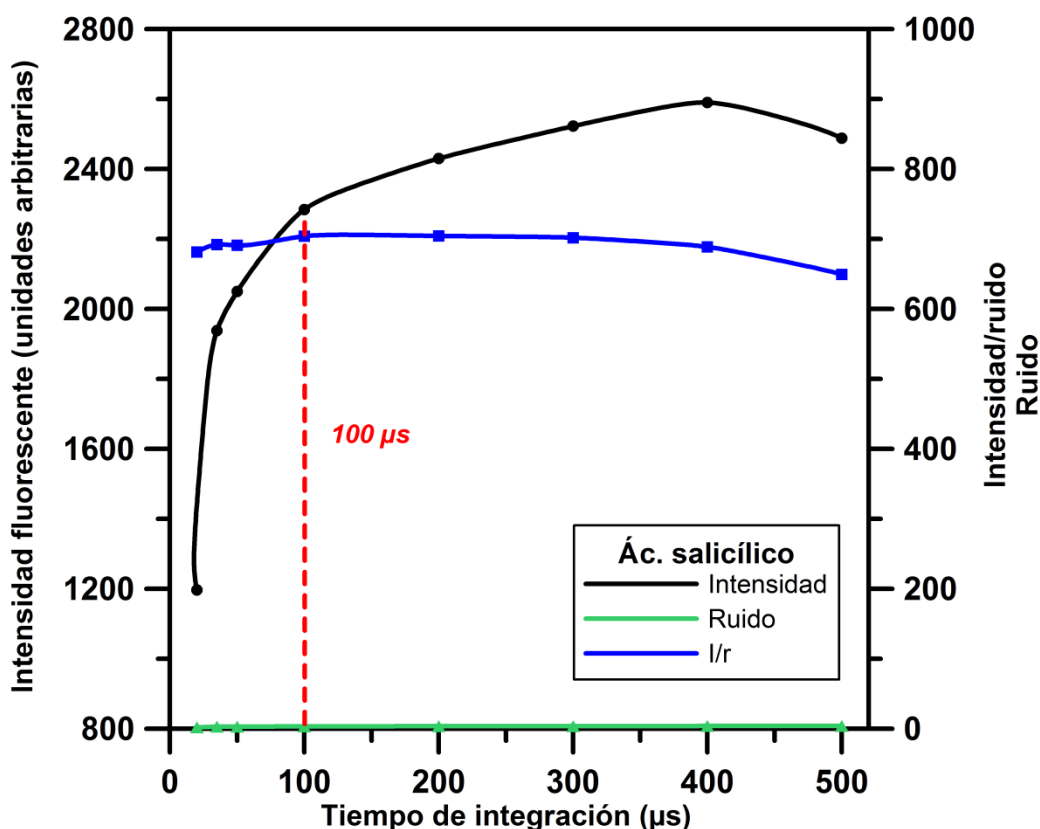
Tabla 2. Parámetros instrumentales iniciales.	
Tiempo de integración	75 μ s
Frecuencia	10 Hz
Número de canales	200
Número de medias	3
Número de disparos	4

4.2.1. Optimización secuencial

Las variables instrumentales que producían una gran variación en la intensidad de fluorescencia (es decir, el tiempo de integración y la frecuencia de disparo) se optimizaron de forma secuencial. Para ello, se tuvo en cuenta tres factores: la variación de la intensidad máxima, el tiempo de registro de las curvas y el ruido instrumental. Como ya se ha indicado, este último se calculó sustrayendo a la cola de la curva de decaimiento obtenida experimentalmente la misma señal tratada con un factor de 21 puntos de suavizado.

4.2.1.1. Optimización del tiempo de integración

En la figura 12 se representa el resultado del estudio de la influencia del tiempo de integración en la señal fluorescente, llevado a cabo en el intervalo comprendido entre 20 y 500 ns.



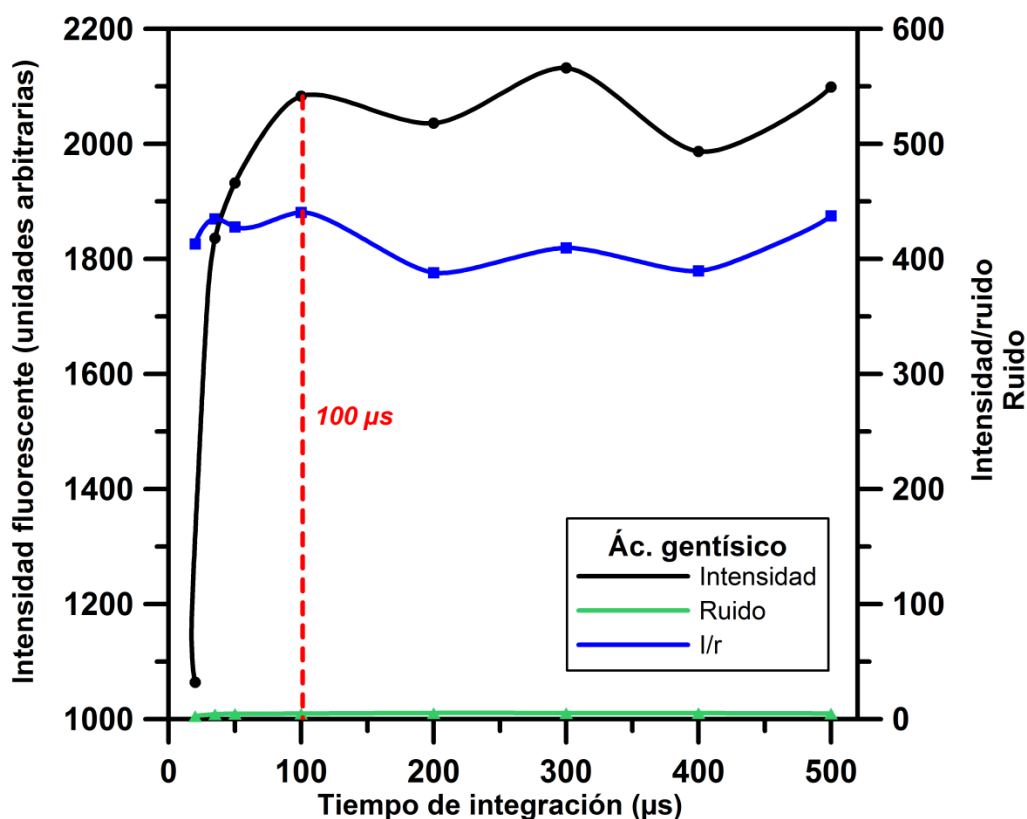


Figura 12. Influencia del tiempo de integración en la señal fluorescente de los ácidos salicílico (arriba) y gentísico (abajo).

Como el tiempo de registro no depende del tiempo de integración, se utilizó como criterio de selección únicamente la maximización de la intensidad y de la relación señal/ruido. Se decidió elegir como tiempo de integración óptimo 100 μs porque a este valor se obtenía una de las máximas relaciones para ambos analitos.

4.2.1.2. Optimización de la frecuencia

Se estudió la frecuencia, es decir el número de disparos por segundo que efectúa el láser, entre 5 y 20 Hz. Al aumentar la frecuencia disminuyen enormemente tanto la intensidad máxima de fluorescencia como la relación señal ruido, así como el tiempo de registro. Por ello, se eligió como frecuencia óptima un valor de compromiso de 10 Hz, tal y como puede verse en la figura 13.

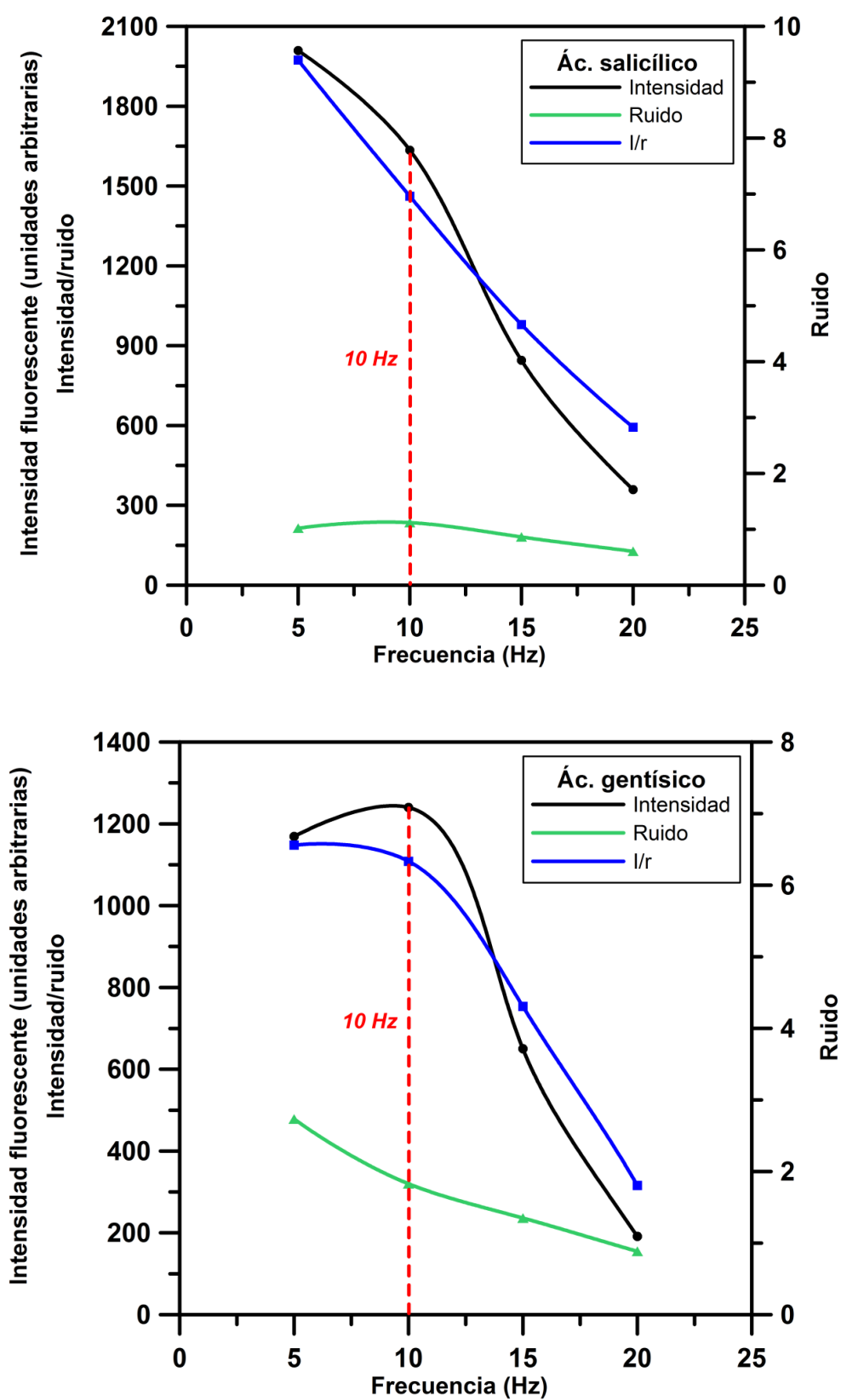


Figura 13. Influencia de la frecuencia de disparos en la señal fluorescente de los ácidos salicílico (arriba) y gentísico (abajo).

4.2.2. Optimización simplex

La variación del resto de variables instrumentales produce cambios semejantes en el ruido instrumental y en el tiempo de registro, pero el valor máximo de intensidad fluorescente se mantiene aproximadamente constante:

- Con el aumento del **número de canales**, o número de puntos que constituye cada curva de decaimiento registrada, se consiguen una mayor resolución y un menor ruido instrumental, a costa de tiempos de análisis más largos. En su optimización se eligieron únicamente valores que fueran múltiplo de 25.
- A mayor **número de medias**, o veces que se registra cada curva, mayor tiempo de análisis pero también menor ruido instrumental.
- Por último, puede conseguirse la disminución del ruido instrumental aumentando el **número de disparos** del láser para cada punto de la curva, si bien actuando de esta forma se provoca un aumento en el tiempo de análisis.

La optimización de estas tres variables se llevo a cabo buscando la maximización de la relación señal/ruido mediante el método de simplex modificado. Se decidió rechazar aquellas combinaciones de variables que implicaran tiempos de registro superiores a quince minutos por curva, a fin de asegurar un método de análisis rápido.

Los simplex empleados en este procedimiento de optimización tienen forma tetraédrica, puesto que el número de vértices de las figuras es siempre uno más que el número de variables implicadas en el proceso. La figura 14 muestra el esquema utilizado para escoger los cuatro puntos del simplex inicial. Gracias a esta estrategia,

para cada variable se necesitaron únicamente dos valores diferentes (A y B), los cuales se escogieron teniendo en cuenta ensayos preliminares.

El proceso de optimización transcurrió tal y como se indicó en el capítulo de esta memoria dedicado a los métodos quimiométricos, comenzando por introducir en el programa informático [251] los valores de cada punto inicial y sus correspondientes relaciones señal/ruido (I/r). Cuando la diferencia entre la mayor y la menor relación señal/ruido de los vértices un simplex fue inferior al 5% se dio por finalizado el proceso de optimización.

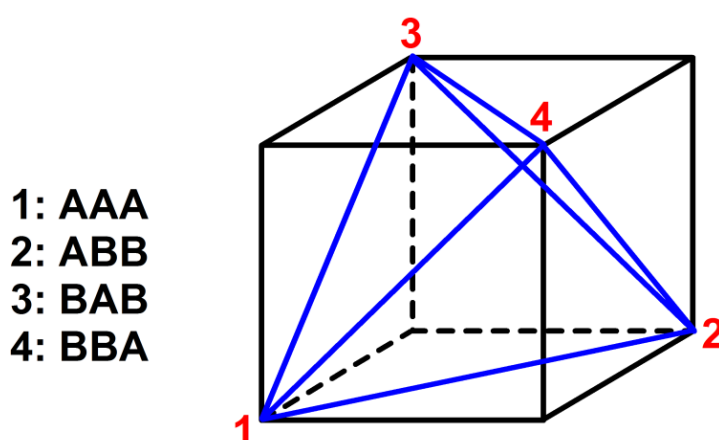


Figura 14. Distribución de los puntos del simplex inicial

4.2.2.1. Optimización simplex para el ácido salicílico

Todo el proceso de optimización simplex para el ácido salicílico se halla recogido en la tabla 3 y la figura 15.

*Tabla 3. Optimización simplex para el ácido salicílico
(R=reflexión; CI=contracción interna; E=expansión).*

Etapas (Caso)	Puntos del simplex	Nº canales	Nº medias	Nº disparos	$\frac{I}{r}$	Error (%)
1 (Caso 4a)	1	200	2	2	918,55	37,8
	2	200	4	4	1476,55	
	3	400	2	4	1048,83	
	4	400	4	2	1103,87	
	5 (R de 1)	425	5	5	0	
	6 (CI)	250	3	3	1232,16	
2 (Caso 1)	2	200	4	4	1476,55	29,0
	6	250	3	3	1232,16	
	4	400	4	2	1103,87	
	3	400	2	4	1048,83	
	7 (R de 3)	150	5	2	1460,52	
3 (Caso 4a)	2	200	4	4	1476,55	25,2
	7	150	5	2	1460,52	
	6	250	3	3	1232,16	
	4	400	4	2	1103,87	
	8 (R de 4)	-5	4	4	0	
	9 (CI)	300	4	3	1247,52	
4 (Caso 2a)	2	200	4	4	1476,55	16,5
	7	150	5	2	1460,52	
	9	300	4	3	1247,52	
	6	250	3	3	1232,16	
	10 (R de 6)	175	6	3	1506,23	
	11 (E)	125	7	3	1529,42	
5 (Caso 4a)	11	125	7	3	1529,42	18,4
	2	200	4	4	1476,55	
	7	150	5	2	1460,52	
	9	300	4	3	1247,52	
	12 (R de 9)	25	7	3	227,50	
	13 (CI)	225	5	3	1405,21	

6 (Caso 1)	11	125	7	3	1529,42	8,1
	2	200	4	4	1476,55	
	7	150	5	2	1460,52	
	13	225	5	3	1405,21	
	14 (R de 13)	100	6	3	1499,97	
FINAL	11	125	7	3	1529,42	4,5
	2	200	4	4	1476,55	
	14	100	6	3	1499,97	
	7	150	5	2	1460,52	

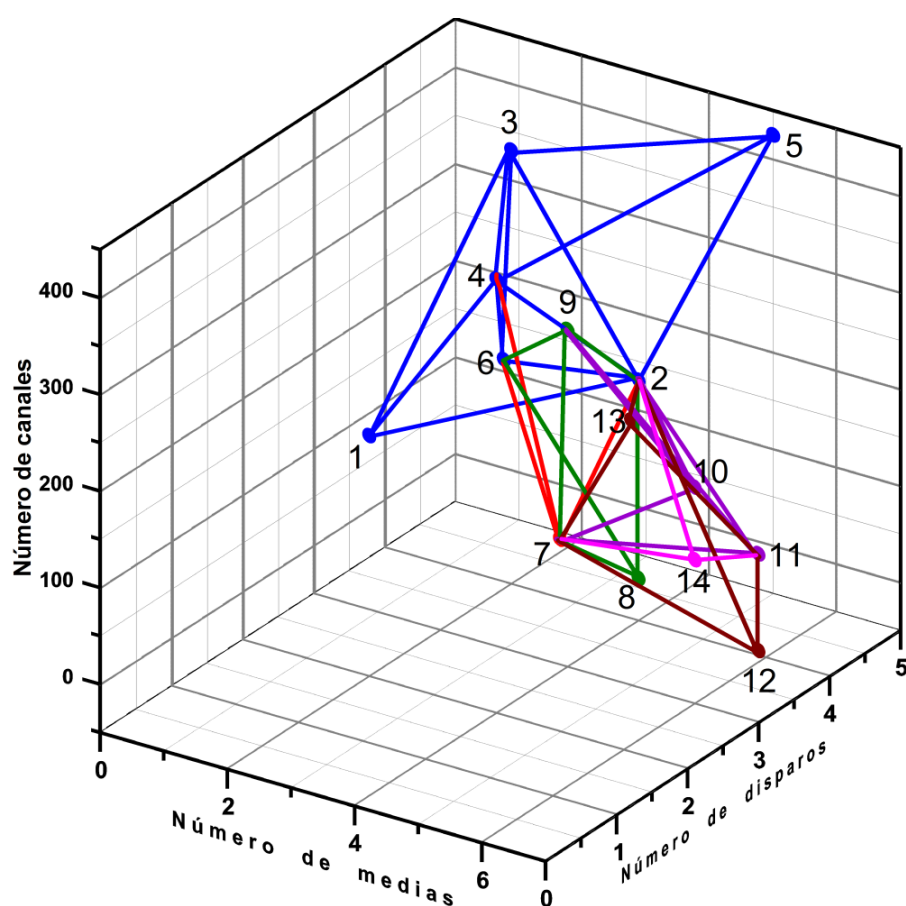


Figura 15. Optimización simplex para el ácido salicílico.

En consecuencia, la convergencia es mayor utilizando el método de simplex modificado y no el método secuencial usado en los trabajos de luminiscencia sensibilizada por lantánidos, ya que el primero de estos métodos implica el análisis de

un menor número de muestras. La figura 16 es una simplificación de la figura 15 que ilustra solamente el simplex de partida (en azul) y el simplex final (en naranja), a fin de poder observar más claramente estos dos momentos del proceso de optimización.

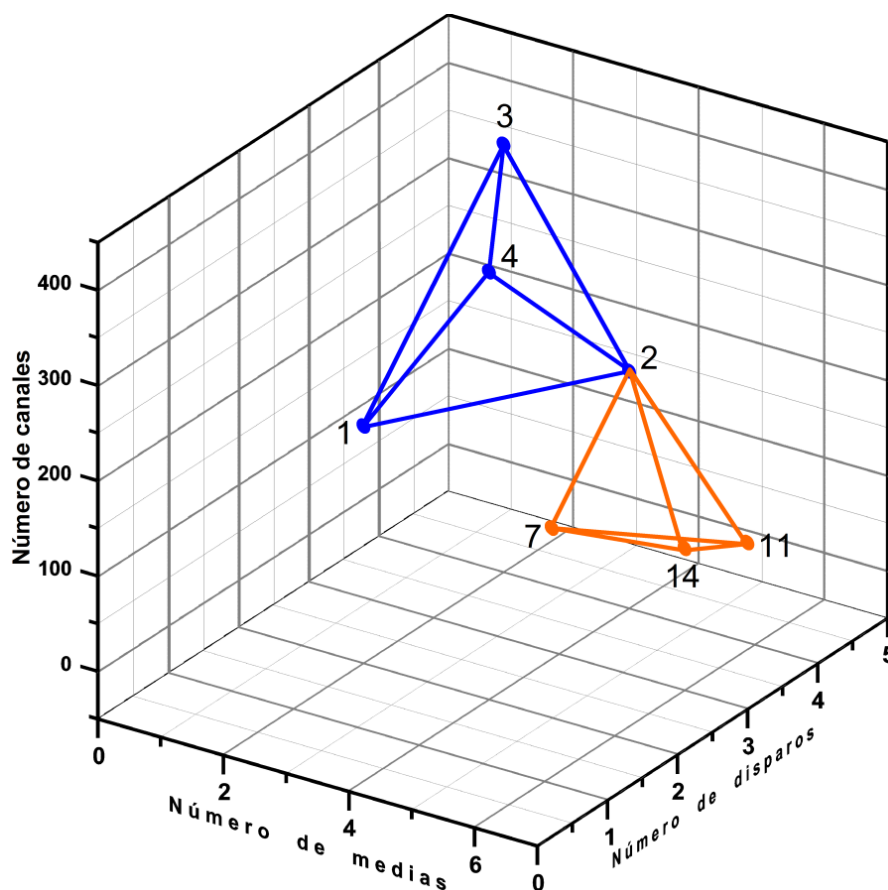


Figura 16. Simplex inicial (en azul) y final (en naranja) en la optimización simplex del ácido salicílico.

La media aritmética de los cuatro puntos del simplex final dio como resultado las condiciones instrumentales óptimas para la determinación del ácido salicílico. La relación señal/ruido de una muestra analizada en estas condiciones se encuentra efectivamente entre la de los cuatro puntos del simplex final, tal y como se recoge en la tabla 4.

Tabla 4. Variables instrumentales optimizadas por el método simplex para el ácido salicílico.

Nº Canales	Nº medias	Nº disparos	$\frac{I}{r}$
150	6	3	1510,76

4.2.2.2. Optimización simplex para el ácido gentísico

En cuanto a la optimización simplex para el ácido gentísico, todo el proceso se halla detallado en la tabla 5 y representado en la figura 17. La figura 18, por su parte, ilustra sólo los simplex inicial (en azul) y final (en negro).

Tabla 5. Optimización simplex para el ácido gentísico (R=reflexión; CI=contracción interna; E=expansión).

Etap (Caso)	Puntos del simplex	Nº canales	Nº medias	Nº disparos	$\frac{I}{r}$	Error (%)
1 (Caso 4a)	1	200	2	2	797,61	40,6
	2	200	4	4	1342,78	
	3	400	2	4	926,27	
	4	400	4	2	943,77	
	5 (R de 4)	425	5	5	0	
	6 (CI)	250	3	3	1067,86	
2 (Caso 1)	2	200	4	4	1342,78	31,0
	6	250	3	3	1067,86	
	4	400	4	2	943,77	
	3	400	2	4	926,27	
	7 (R de 3)	150	5	2	1159,74	
3 (Caso 4a)	2	200	4	4	1342,78	29,7
	7	150	5	2	1159,74	
	6	250	3	3	1067,86	
	4	400	4	2	943,77	
	8 (R de 4)	-3	4	4	0	
	9 (CI)	300	4	3	1229,66	

4 (Caso 2a)	2	200	4	4	1342,78	20,5
	9	300	4	3	1229,66	
	7	150	5	2	1159,74	
	6	250	3	3	1067,86	
	10 (R de 6)	175	6	3	1489,34	
	11 (E)	150	7	3	1590,66	
5 (Caso 1)	11	150	7	3	1590,66	27,1
	2	200	4	4	1342,78	
	9	300	4	3	1229,66	
	7	150	5	2	1159,74	
	12 (R de 7)	275	5	5	1361,04	
6 (Caso 1)	11	150	7	3	1590,66	22,7
	12	275	5	5	1361,04	
	2	200	4	4	1342,78	
	9	300	4	3	1229,66	
	13 (R de 9)	100	7	5	1554,03	
7 (Caso 2b)	11	150	7	3	1590,66	15,6
	13	100	7	5	1554,03	
	12	275	5	5	1361,04	
	2	200	4	4	1342,78	
	14 (R de 2)	150	9	5	0	
	15 (CI)	175	5	4	1516,02	
8 (Caso 2b)	11	150	7	3	1590,66	14,4
	13	100	7	5	1554,03	
	15	175	5	4	1516,02	
	12	275	5	5	1361,04	
	16 (R de 12)	8	8	3	223,16	
	17 (CI)	200	6	4	1474,11	
9 (Caso 4a)	11	150	7	3	1590,66	7,3
	13	100	7	5	1554,03	
	15	175	5	4	1516,02	
	17	200	6	4	1474,11	
	18 (R de 17)	75	7	4	1131,58	
	19 (CI)	175	6	4	1524,74	
FINAL	11	150	7	3	1590,66	4,7
	13	100	7	5	1554,03	
	19	175	6	4	1524,74	
	15	175	5	4	1516,02	

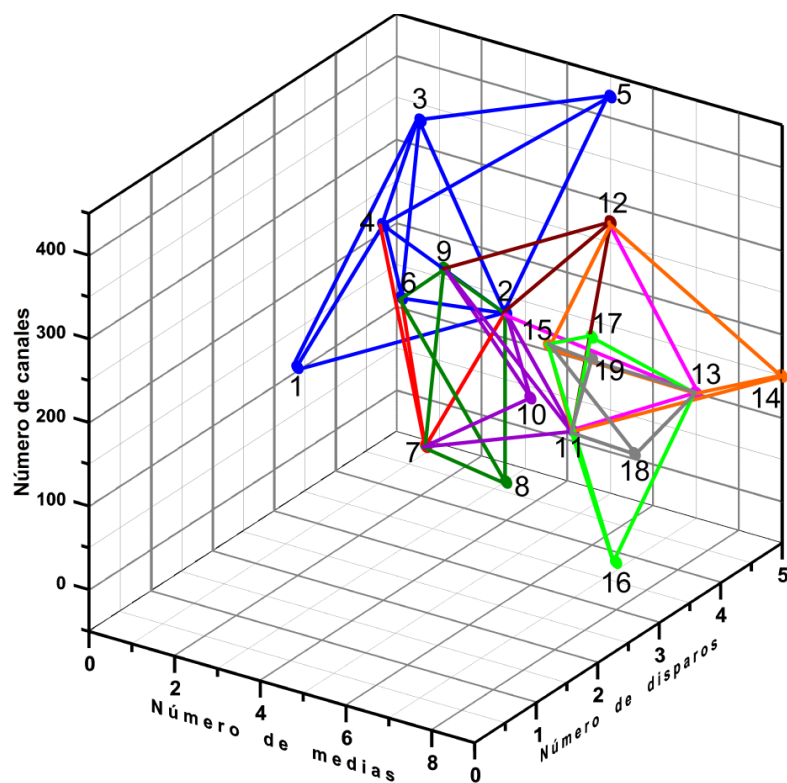


Figura 17. Optimización simplex para el ácido gentísico.

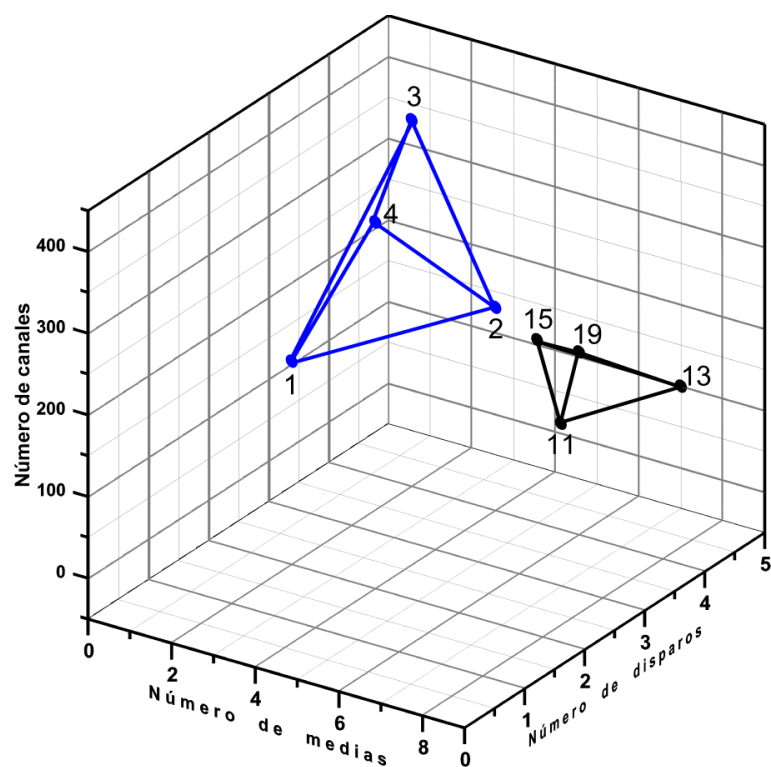


Figura 18. Simplex inicial (en azul) y final (en negro) en la optimización simplex del ácido gentísico.

En la tabla 6 pueden verse las condiciones instrumentales óptimas elegidas, calculadas como la media aritmética de todos los puntos del simplex final, así como la relación señal/ruido obtenida al analizar una muestra de ácido gentísico en esas condiciones.

<i>Tabla 6. Variables instrumentales optimizadas por el método simplex para el ácido gentísico.</i>			
Nº Canales	Nº medias	Nº Disparos	$\frac{I}{r}$
150	6	4	1538,89

En consecuencia, tanto el número óptimo de canales como el de medias es el mismo para los dos analitos. Sin embargo, el número de disparos óptimo hallado difiere ligeramente: es tres para el ácido salicílico y cuatro para el ácido gentísico. Se decidió tomar un valor de tres porque implicaba un menor tiempo de registro por curva de decaimiento y porque para ambos analitos el punto del simplex que tenía un valor máximo de intensidad fue registrado con tres disparos.

Los valores seleccionados para todas las variables estudiadas, tanto químicas como instrumentales, se hallan resumidos en las tablas 7 y 8.

<i>Tabla 7. Valores óptimos escogidos para las variables químicas.</i>	
pH	5,5
[Tampón Acetato]	0,05 mol L ⁻¹
Temperatura	20 °C

Tabla 8. Valores óptimos escogidos para las variables instrumentales.

Tiempo de integración	100 μ s
Frecuencia	10 Hz
Número de canales	150
Número de medias	6
Número de disparos	3

5. Estudio de la linealidad

El siguiente paso fue un estudio para determinar en qué intervalo las respuestas instrumentales son lineales con respecto a las concentraciones de los analitos. Esto es fundamental, puesto que se trata de un requisito para poder aplicar el modelo de calibración multivariante PLS-1.

Dentro del rango dinámico comprendido entre 1,0 y 10000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, se registraron disoluciones con diferentes concentraciones de los ácidos salicílico y gentísico en las condiciones químicas e instrumentales óptimas seleccionadas. La máxima intensidad fluorescente aparece representada frente a la concentración de los analitos en la figura 19. Puede verse que la respuesta es lineal entre 1,0 y 6000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido salicílico y entre 1,0 y 2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el ácido gentísico. Además, la figura 20 (ampliaciones de los rangos lineales de la figura 19) muestra que el ajuste de los datos a rectas mediante el método de mínimos cuadrados lleva asociado coeficientes de la determinación muy cercanos a la unidad en ambos casos.

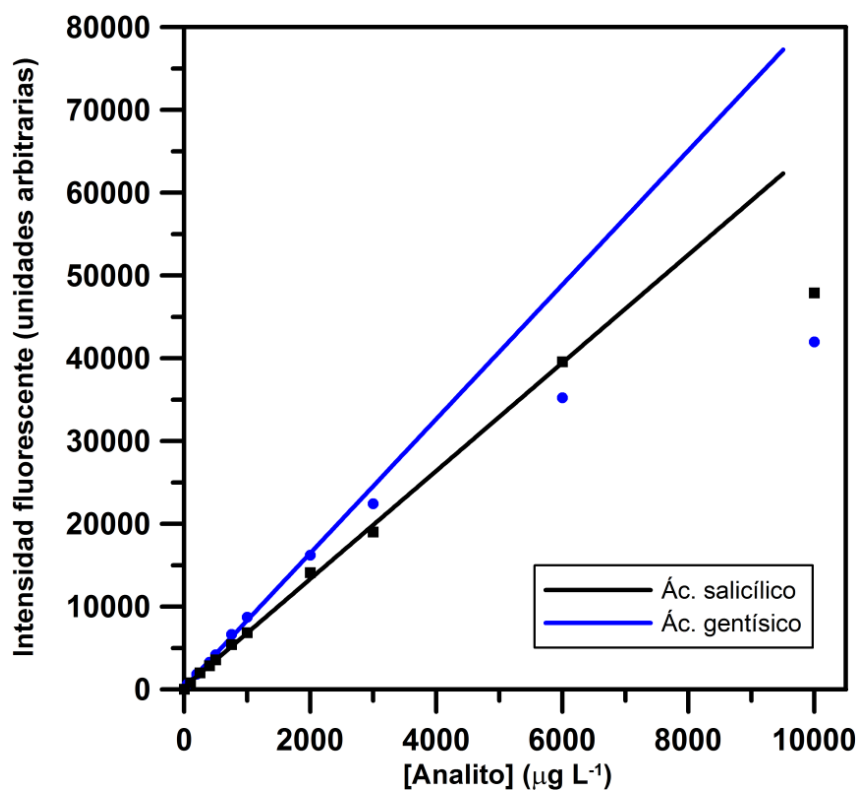
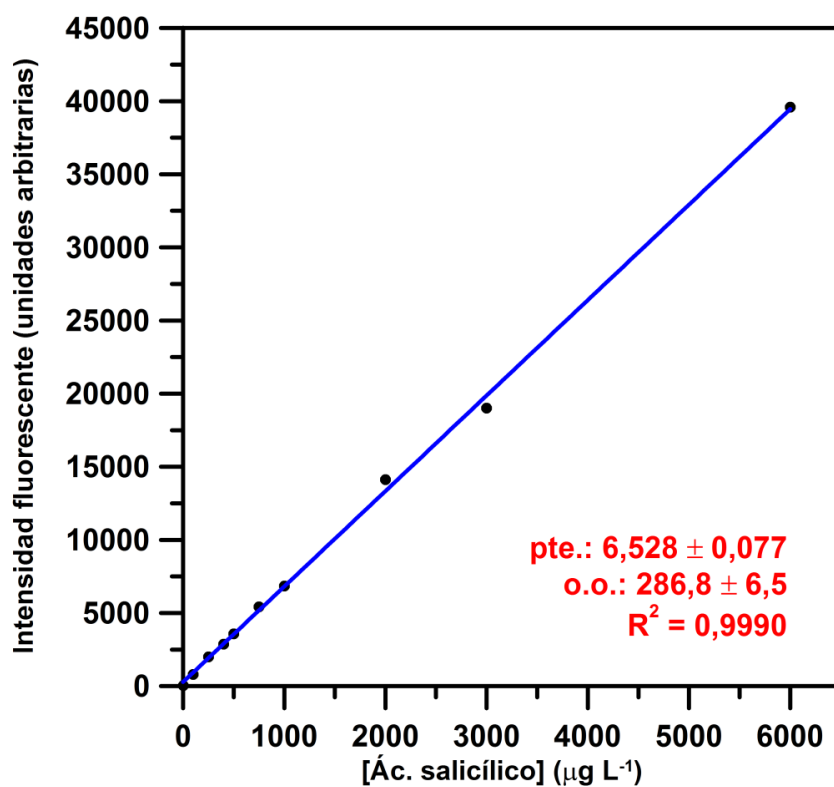


Figura 19. Estudio de linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de los ácidos salicílico y gálico.



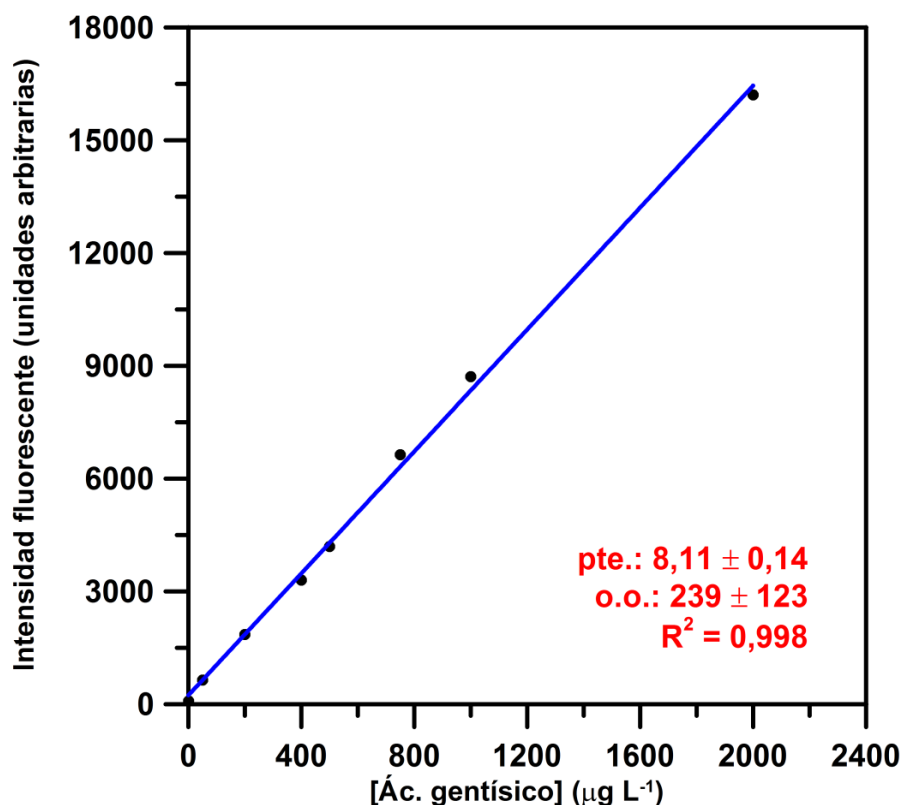


Figura 20. Intervalos de respuesta lineal entre la intensidad de luminiscencia y la concentración del ácido salicílico (arriba) y del ácido gentísico (abajo), y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

6. Aplicación del modelo PLS-1

6.1. Selección y optimización de los datos de la matriz de calibración

Teniendo en cuenta tanto los intervalos de linealidad obtenidos como la intensidad fluorescente relativa de los dos analitos, se eligieron niveles de concentraciones máximos de $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambos en el diseño de la matriz de calibración multivariante, ya que a estas concentraciones la intensidad fluorescente es prácticamente igual para los dos. Se aplicó de nuevo el diseño factorial con tres niveles por factor combinado con un diseño central compuesto (trece muestras de calibración). La tabla 8 y la figura 21 muestran que, a fin de maximizar estadísticamente la información contenida en las curvas de decaimiento, también se incluyó un blanco analítico en el diseño de la matriz de calibración.

Tabla 8. Concentraciones de los analitos en cada punto de la matriz de calibración.

Muestra	[Ác. salicílico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ác. gentísico] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	74,0	74,0
2	74,0	252,0
3	74,0	430,0
4	252,0	74,0
5	252,0	252,0
6	252,0	430,0
7	430,0	74,0
8	430,0	252,0
9	430,0	430,0
10	252,0	0
11	252,0	500,0
12	0	252,0
13	500,0	252,0
14	0	0

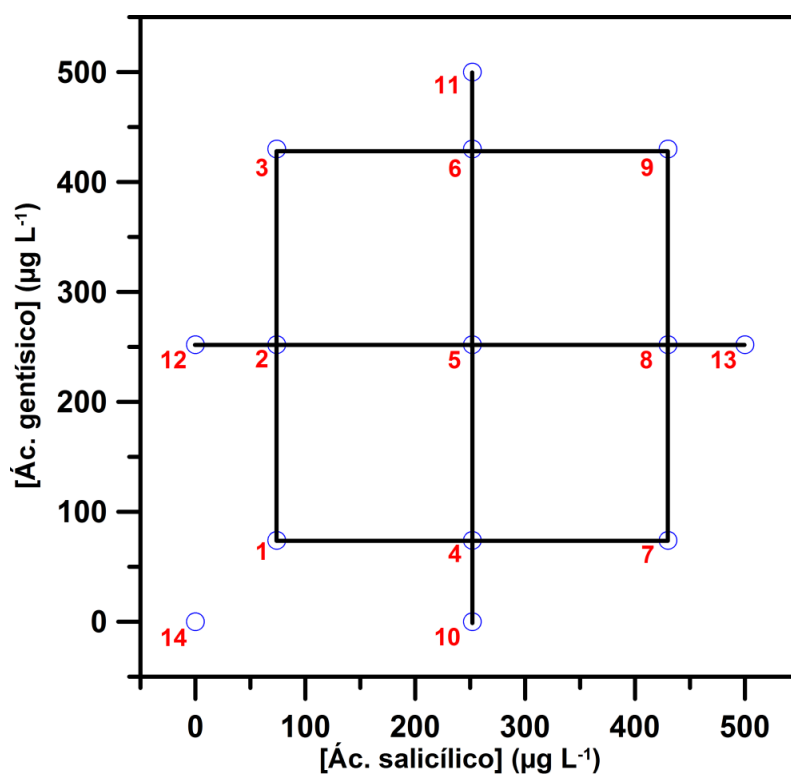


Figura 21. Representación gráfica del esquema utilizado en la matriz de calibración.

Por su parte, la figura 22 ilustra todas las curvas de decaimiento fluorescente, registradas las en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, que constituyeron la matriz de calibración. Son quince y no catorce porque se comprobó que utilizando dos blancos en vez de uno mejoraban los resultados obtenidos

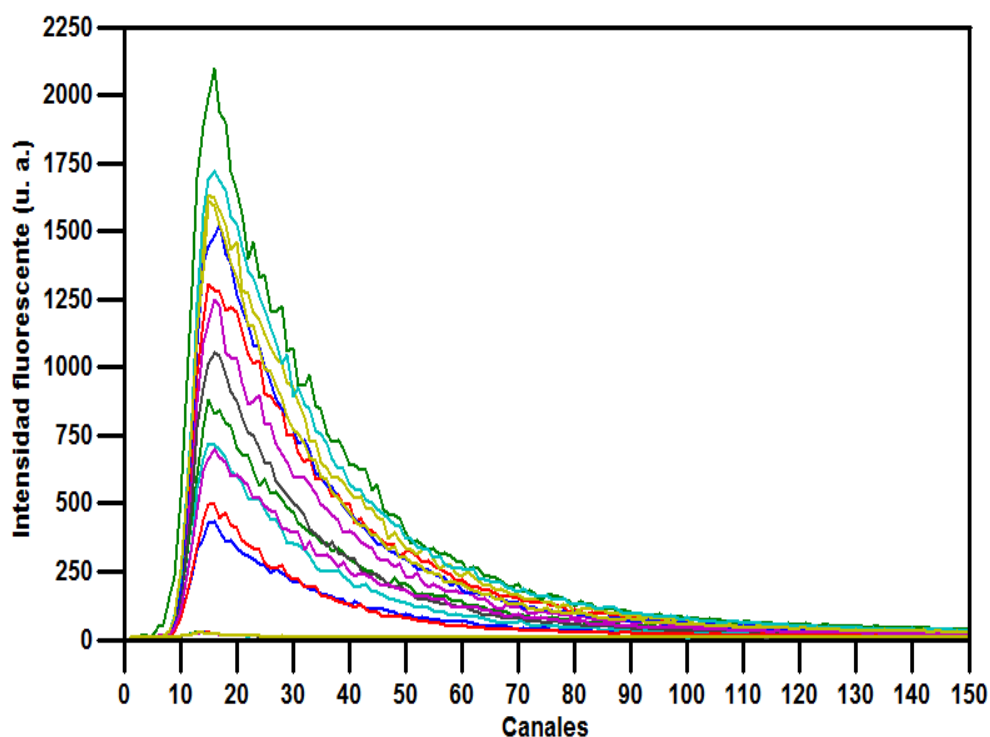


Figura 22. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

Las curvas mostradas en la figura 21 se exportaron a archivos de texto, los cuales se introdujeron en la subrutina MVC-1 de Matlab [252] para desarrollar el mejor modelo de calibración posible utilizando como algoritmo el PLS, debido a sus ventajas frente a otros semejantes [274]. La optimización de los datos de calibración incluye estudiar los intervalos temporales a introducir en el modelo, el número de factores que constituyen el mismo y la posible presencia de puntos discrepantes.

6.1.1. Intervalos temporales óptimos

En ocasiones, los resultados obtenidos al aplicar la subrutina MVC-1 no son satisfactorios cuando se utilizan en el modelo las curvas de decaimiento completas. Este hecho se debe a que aquéllas zonas de las mismas que carecen de información de interés acerca de los analitos en estudio perjudican el desarrollo del método quimiométrico. En este caso concreto, los mejores resultados estadísticos (R^2 más cercano a la unidad y errores SEP y REP lo más bajos posible tras efectuar validaciones cruzadas) se obtuvieron cuando se consideró únicamente el intervalo de puntos comprendido entre los canales 16 y 150, tanto para el ácido salicílico como para el ácido gentísico.

6.1.2. Número de factores óptimo

Se utilizó el método de validaciones cruzadas para optimizar el número de factores para cada analito. En la subrutina de Matlab se introdujo inicialmente cuatro factores, un valor previsiblemente mayor que el necesario para una mezcla binaria (que suele ser dos). Tal y como muestran las tablas 9 y 10, el número óptimo de factores es tres para el ácido salicílico y dos para el ácido gentísico, pues es entonces cuando la probabilidad para la razón F (P) es por primera vez menor que 0,75 (criterio de Haaland y Thomas [238]).

6.1.3. Datos discrepantes

Como la razón F para todas las curvas de decaimiento es siempre inferior a la unidad, puede considerarse que no existen datos discrepantes en el modelo de calibración [238].

Tabla 9. Optimización del número de factores (canales del 16 al 150).

Número de factores	Ácido salicílico			Ácido gentísico		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P
0	487790	194,58	0,999	487790	166,25	0,999
1	291100	116,13	0,999	108940	37,13	0,999
2	4042,5	1,61	0,817	3672,9	1,25	0,665
3	2830,6	1,13	0,591	3323,6	1,13	0,593
4	2506,8	1	0,499	2934,1	1	0,499

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R ²
Ác. salicílico	3	14	6,3	0,993
Ác.gentísico	2	16	7,2	0,991

6.2. Predicción de muestras sintéticas (validación del método)

Nueve muestras con concentraciones de ambos analitos comprendidas dentro de los intervalos de calibración se prepararon haciendo uso del programa de generación de números aleatorios [253], de tal forma que estuvieran repartidas dentro de los mismos. Dichas muestras se registraron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas, obteniéndose las curvas de la figura 23.

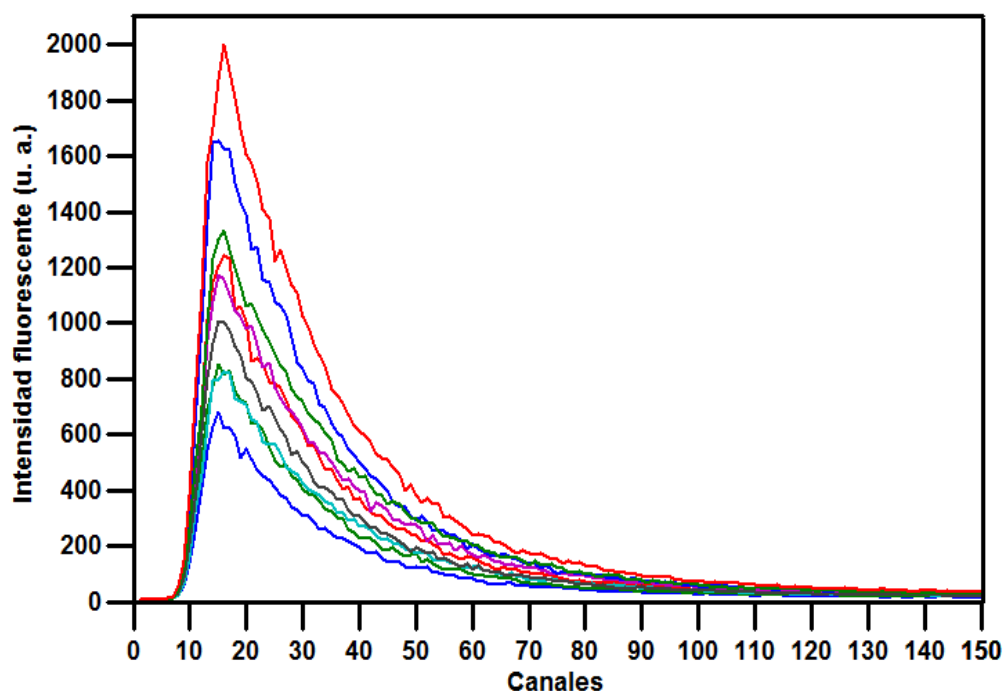


Figura 23. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

El contenido en ácido salicílico y ácido gentísico de cada una de las muestras de validación se predijo utilizando la matriz de calibración desarrollada previamente, tal y como queda recogido en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Predicción del contenido en ácido salicílico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S _d	RES (%)	Recuperación (%)
1	190,0	197,2	6,2	2,9	103,8
2	274,0	277,6	8,8	3,3	101,3
3	350,0	345,7	14,0	3,4	98,8
4	118,0	122,0	7,2	2,6	103,4
5	156,0	148,5	12,0	2,9	95,2
6	448,0	450,0	13,5	2,5	100,5
7	298,0	294,7	9,1	3,0	98,9
8	134,0	130,2	11,7	2,7	97,1
9	478,0	478,1	16,1	2,4	100,0

Tabla 12. Predicción del contenido en ácido gentísico de muestras sintéticas.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	s_d	RES (%)	Recuperación (%)
1	90,0	88,9	5,1	3,0	98,8
2	98,0	103,2	6,3	3,3	105,3
3	184,0	180,4	8,9	3,1	98,0
4	196,0	199,0	5,4	2,8	101,5
5	322,0	315,2	7,8	2,9	97,9
6	270,0	274,1	9,2	2,6	101,5
7	150,0	150,6	6,3	3,0	100,4
8	378,0	377,4	8,4	2,6	99,8
9	392,0	393,2	10,8	2,4	100,3

Como en todos los casos el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra próximo al 100 %, al representar las concentraciones de los analitos que el modelo PLS-1 predice frente a las añadidas y ajustar los datos a una línea recta mediante mínimos cuadrados se obtienen coeficientes de la determinación muy cercanos a la unidad (véase la figura 24).

Además, dentro de las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen a un nivel de confianza del 95% se encuentran el punto pendiente unidad y ordenada cero, hecho que indica que al nivel de confianza elegido las diferencias entre los valores teóricos y experimentales de la pendiente y de la ordenada en el origen no son estadísticamente significativas [275]. En la figura 25 se representan dichas regiones elípticas, considerando tanto una regresión por mínimos cuadrados como por mínimos cuadrados ponderados.

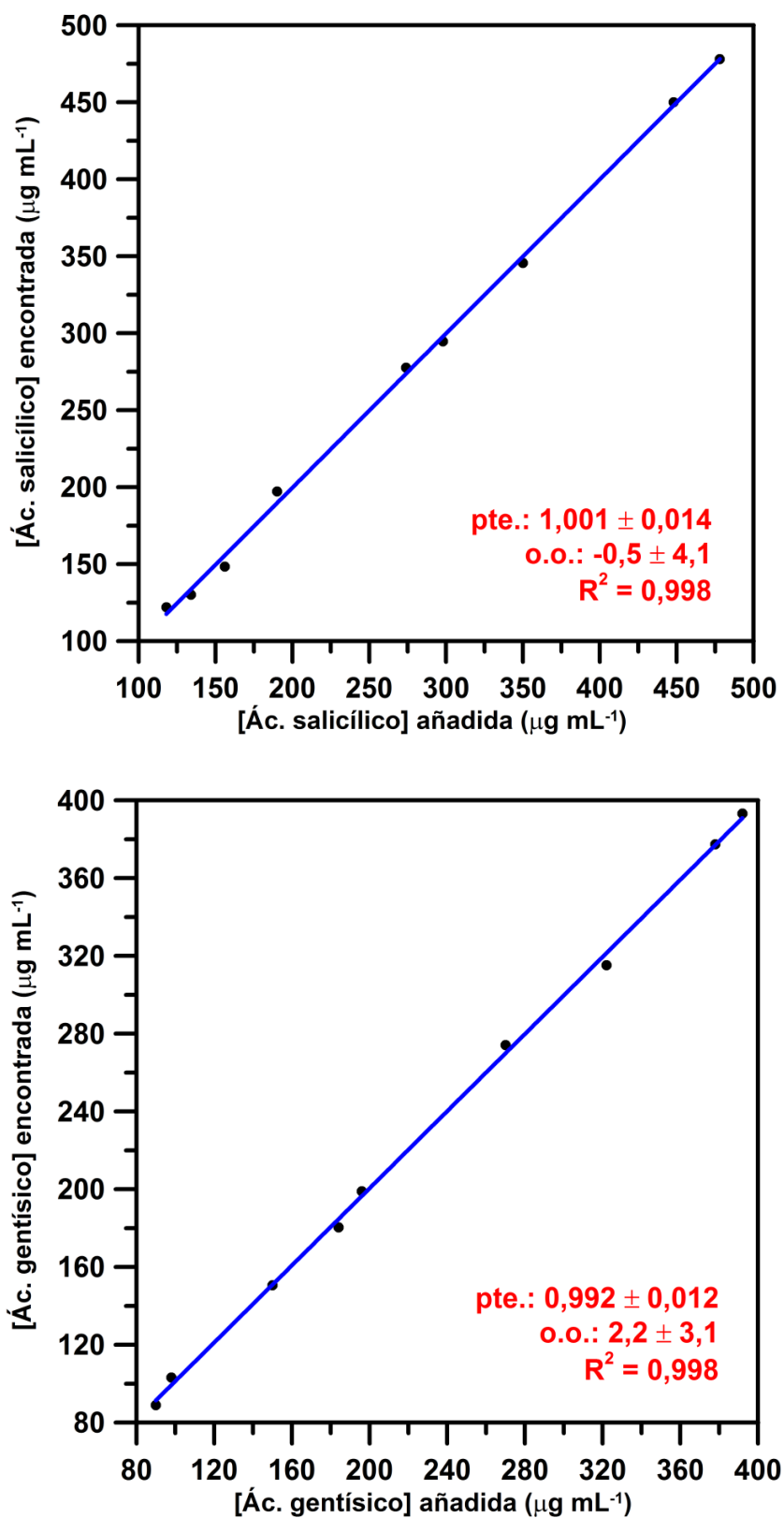


Figura 24. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido salicílico (arriba) y para el ácido gentísico (abajo), y ajustes a rectas por mínimos cuadrados.

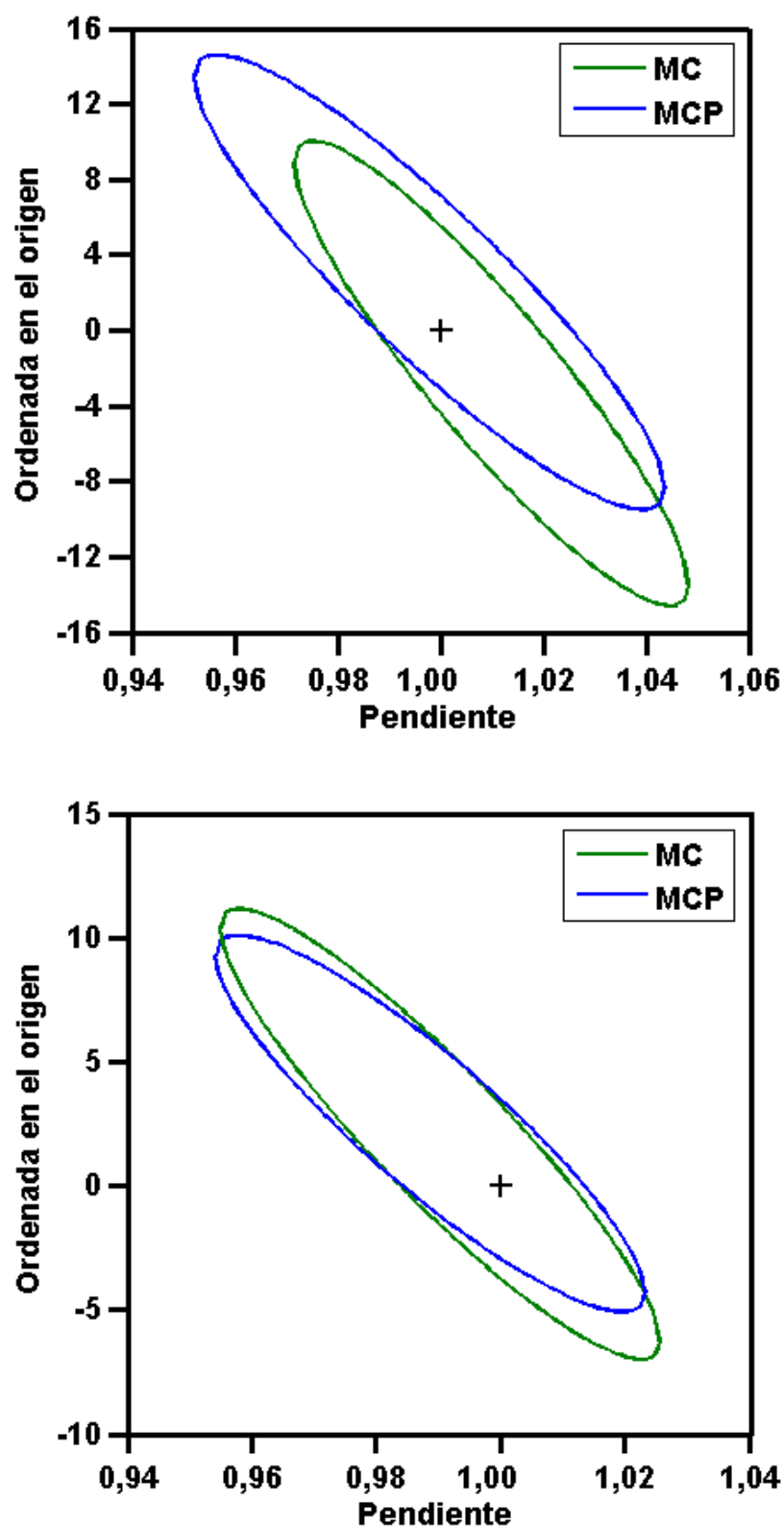


Figura 25. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para el ácido salicílico (arriba) y el ácido gentísico (abajo), considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (azul).

7. Cálculo de los límites de detección

Siguiendo las recomendaciones de la IUPAC [240], nuestro grupo de investigación desarrolló un criterio [224, 276] para calcular los límites de detección de un método de análisis multivariante: el límite de detección es tres veces la desviación estándar de diez replicados del blanco analítico dividido entre la pendiente de la recta que relaciona las concentraciones de analito añadidas y las encontradas mediante la modelo desarrollado. Todos estos datos pueden encontrarse en la tabla 13. Los límites de detección calculados son los esperados para métodos fluorimétricos que determinan ácido salicílico y ácido gentísico [435].

Tabla 13. Cálculo de los límites de detección (LD).

Analito	S_b (µg L⁻¹)	b	LD (µg L⁻¹)
Ácido salicílico	1,2	1,0	3,5
Ácido gentísico	0,55	0,99	1,66

8. Estudio de la precisión del método

La precisión del método propuesto se estudio prediciendo diez replicados de una disolución que contenía 300,0 µg L⁻¹ de ácido salicílico y 180,0 µg L⁻¹ de ácido gentísico mediante el modelo desarrollado y calculando la media y la desviación estándar de estas medidas, tal y como muestra la tabla 14. Los resultados obtenidos indican que el método obtenido es suficientemente exacto y preciso.

Tabla 14. Predicción de diez replicados de una muestra que contenía $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido salicílico y $180,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido gentísico.

Muestra	[Ác. salicílico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Ác. gentísico] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	304,4	180,3
2	295,9	181,0
3	290,4	178,3
4	293,1	182,5
5	308,4	183,6
6	304,1	183,9
7	301,4	182,6
8	294,2	184,7
9	297,4	179,3
10	304,2	177,6
Valor medio	$299,3 \pm 6,0$	$181,4 \pm 2,5$

9. Aplicaciones del método propuesto

9.1. Aplicación a preparaciones farmacéuticas

No se encontraron medicamentos que contuvieran en su composición ácido gentísico, puesto que éste es un metabolito que se forma en el organismo de forma natural a partir de la administración oral del ácido salicílico o del ácido acetil salicílico. Sí pudieron adquirirse en una farmacia local tres medicamentos que contenían ácido salicílico para uso cutáneo:

- **Diprosalic** Pomada (Farmacéutica Essex, S. A., Alcobendas, Madrid) contiene en su composición 0,5 mg de dipropionato de betametasona y 30 mg de ácido salicílico por cada gramo de pomada. Se pesó un gramo de la misma y se disolvió en NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 30°C haciendo uso de 30 minutos de baño de ultrasonidos. El líquido se filtró a través de un papel de filtro para análisis

cuantitativo DP 145 125 (Albet) en un matraz aforado de 500 mL que se enrasó con NaOH 0,01 mol L⁻¹, obteniéndose así una disolución madre de 30,0 mg L⁻¹ de ácido salicílico, la cual se diluyó 15 veces para finalmente usarse como disolución de partida para las medidas.

- El **Callicida Rojo** (Laboratorio ESCANED, Madrid) contiene 12 gramos de ácido salicílico y 6 g de ácido acético por cada 100 gramos de preparado líquido. Se pesaron exactamente 250 mg de dicho preparado farmacéutico y se diluyeron a 1000 mL en un matraz aforado utilizando NaOH 0,01 mol L⁻¹. El resultado fue una disolución madre de 30,0 mg L⁻¹ de ácido salicílico que se diluyó de nuevo 15 veces para que pudiera usarse como disolución de partida para las medidas.
- Por último, el **Antiverrugas ISDIN** (ISDIN, Barcelona; fabricado por Solvay Pharma, S.L., Parets del Vallés, Barcelona) es una solución que contiene 16,7 g de ácido salicílico y 16,7 g de ácido láctico por cada 100 mL de producto. Se tomaron 0,4 mL de líquido y se enrasaron a 1000 mL en un matraz aforado utilizando NaOH 0,01 mol L⁻¹, para obtener una disolución madre 66,8 mg L⁻¹ de ácido salicílico, la cual se diluyó a otra de 2,0 mg L⁻¹, que fue la que finalmente se utilizó como disolución de partida para las medidas.

Se prepararon tres muestras diferentes de cada una de estos tratamientos cutáneos, y a continuación se diluyeron para que las concentraciones de los analitos estuvieran incluidas en los intervalos lineales del método desarrollado. Se analizaron tanto muestras que contenían sólo el medicamento, como muestras que además contenían cantidades adecuadas de un patrón de ácido gentísico, a fin de comprobar si en muestras reales era posible la determinación simultánea de ambos analitos. Las disoluciones resultantes se midieron en las condiciones químicas e instrumentales óptimas y se predijo las concentraciones de los analitos en cada muestra mediante PLS, obteniéndose los resultados contenidos en la tabla 15, donde se expresan como porcentaje de recuperación medio de los tres replicados de cada muestra analizados.

Tabla 15. Resultados del análisis de muestras de preparaciones cutáneas que contenían en su composición ácido salicílico (AS) en ausencia y presencia de ácido gentísico (AG).

Preparación Farmacéutica	[Analito] nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)		[Analito] encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)	
	AS	AG	AS	AG	AS	AG	AS	AG
Diprosalic	250,0	-	0	0	248,2	-	99,3	-
	250,0	-	0	130,0	249,8	131,7	99,9	101,3
Callicida rojo	250,0	-	0	0	251,1	-	100,4	-
	250,0	-	0	130,0	250,7	100,3	100,3	101,1
Antiverrugas	250,0	-	0	0	251,6	-	100,7	-
	250,0	-	0	130,0	256,2	126,5	102,5	97,3

Puesto que los porcentajes de recuperación medios se encuentran cercanos al 100% ($100,5 \pm 1,1$ % para el ácido salicílico y $99,9 \pm 2,3$ % para el ácido gentísico), se confirma que el método propuesto puede utilizarse en el análisis rutinario de preparaciones farmacéuticas cuyo principio activo sea ácido salicílico. Además, no se encontraron interferencias por parte de excipientes o de otros componentes presentes en estas preparaciones (principalmente, dipropionato de betametasona, ácido acético y ácido láctico), y el ácido gentísico puede determinarse también simultáneamente.

9.2. Aplicación del método a muestras de orina humana

Las muestras de orina de tres voluntarios a los que no se había administrado ningún tipo de medicamento se tomaron por la mañana temprano, se centrifugaron inmediatamente durante quince minutos y se diluyeron con agua destilada. Dichas muestras contenían compuestos que presentan fluorescencia moderadamente intensa a las longitudes de onda utilizadas en la determinación simultánea de ácidos salicílico y gentísico [277], tal y como muestra la figura 25.

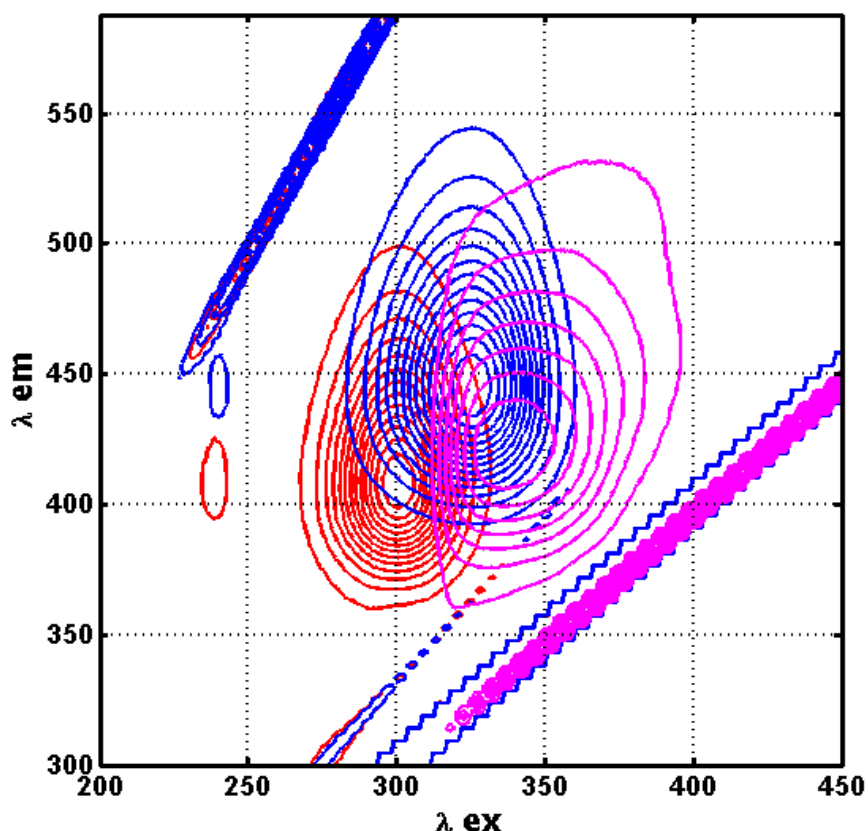


Figura 25. Curvas de nivel que muestran la fluorescencia total del ácido salicílico (en rojo), del ácido gentísico (en azul) y de la orina humana (en rosa).

Además, las curvas de decaimiento fluorescente de los analitos y de la orina son muy semejantes, tal y como ilustra la figura 26. De hecho, el tiempo de vida de fluorescencia de la orina es de alrededor de 8 ns (calculado mediante el algoritmo de Marquardt [247]), es decir, muy cercano al de los metabolitos de la aspirina estudiados en este trabajo. De hecho, se comprobó que, al tratar de predecir las concentraciones de ácidos salicílico y gentísico en muestras sintéticas de orina mediante el modelo de calibración desarrollado anteriormente, dicho modelo no era capaz de discernir claramente entre las curvas de decaimiento de los ácidos salicílico y gentísico y de la orina, por lo que se obtenían predicciones muy pobres.

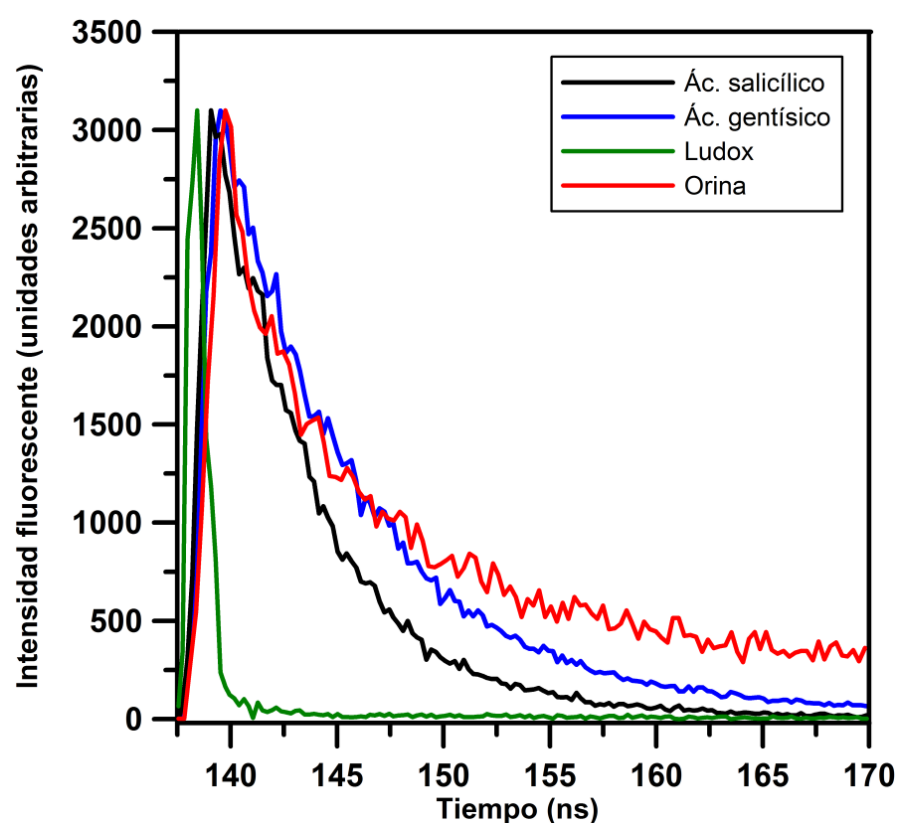


Figura 26. Curvas de decaimiento fluorescente normalizadas del ácido salicílico ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$), del ácido gentísico ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) y de la orina (200,0 diluciones) ($\text{pH } 5,5$; $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 428 \text{ nm}$). Se empleó también una disolución dispersante para registrar la señal debida a la fuente de excitación.

Por ello, en este caso se optó por desarrollar de nuevo la misma matriz de calibración usada en ausencia de orina (un diseño factorial con tres niveles por factor combinado con un diseño central compuesto; véase la figura 21), pero esta vez incluyendo en la composición de cada muestra sintética una cantidad constante de orina (concretamente, 200,0 diluciones). Todas las muestras de esta matriz de calibración se analizaron utilizando las condiciones químicas e instrumentales óptimas. Como se observó que los resultados obtenidos mejoraban aumentando el número de replicados del blanco que se incluía en el modelo, finalmente se incluyeron cinco blancos analíticos. En la figura 27 se muestran las 18 curvas de decaimiento fluorescente que constituyeron la matriz de calibración.

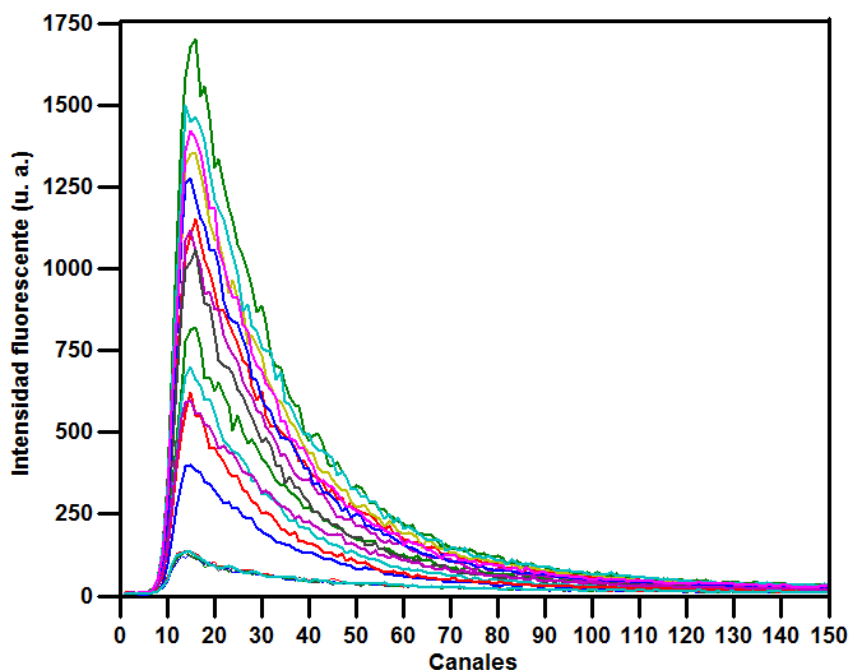


Figura 27. Curvas de decaimiento que constituyen la matriz de calibración.

Todas las curvas se exportaron a archivos de texto y mediante la subrutina MVC-1 de Matlab [252] se estudió los intervalos temporales a introducir, el número óptimo de factores y la posible presencia de puntos discrepantes, siguiendo los criterios explicados anteriormente (determinación simultánea de ácidos salicílico y gentísico en ausencia de orina). Los resultados de todos estos estudios aparecen recogidos en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Optimización del número de factores
(canales del 11 al 110 para el ácido salicílico
y del 14 al 140 para el ácido gentísico).

Número de factores	Ácido salicílico			Ácido gentísico		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P
0	609740	160,13	0,999	609740	158,4	0,999
1	248140	65,17	0,999	135450	35,2	0,999
2	4670,7	1,23	0,665	3849,9	1	0,499
3	4236,3	1,11	0,588	4307,9	0	0
4	3807,8	1	0,499	5128,1	0	0

Tabla 17. Parámetros estadísticos de la calibración multivariante.

Analito	Número de factores	SEP	% REP	R ²
Ácido salicílico	2	16	8,9	0,991
Ácido gentísico	2	15	8,0	0,992

El número óptimo de factores fue dos tanto para el ácido salicílico como para el ácido gentísico, y en ninguno de los casos se encontraron muestras discrepantes [238].

Seguidamente, la capacidad predictiva del método desarrollado se puso a prueba midiendo en las condiciones químicas e instrumentales óptimas diez muestras que contenían concentraciones de los analitos, aleatorias pero siempre dentro de los intervalos de calibración [253], y prediciéndolas con la matriz de calibración obtenida. La dilución de las distintas orinas fue 1/200 en todos los casos. Las diez curvas registradas se muestran en la figura 27 y los resultados de su análisis en las tablas 18 y 19.

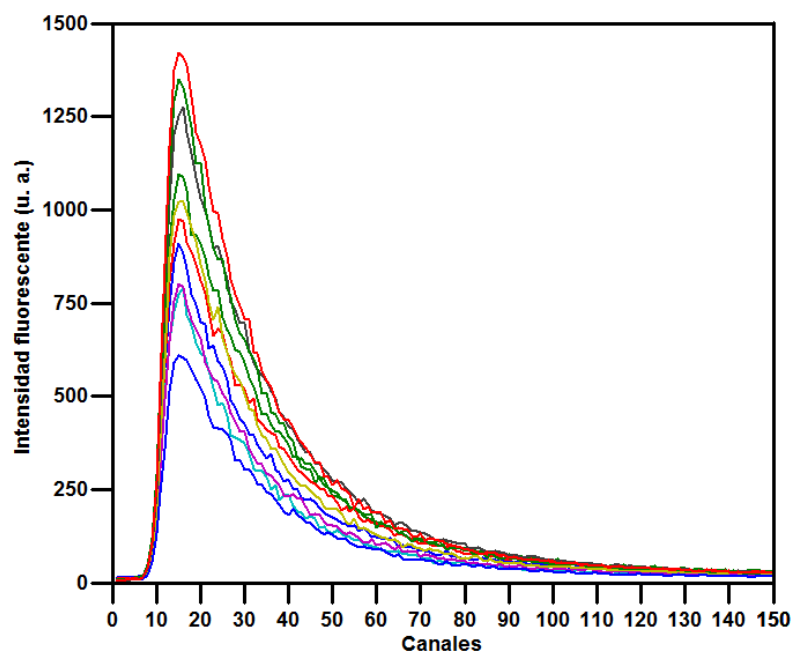


Figura 27. Curvas de decaimiento usadas en la validación del método.

Tabla 18. Predicción del contenido en ácido salicílico de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S _d	RES (%)	Recuperación (%)
1	236,0	243,6	9,9	3,1	103,2
2	138,0	133,8	12,2	2,7	96,9
3	90,0	89,3	11,6	2,6	99,2
4	304,0	295,6	11,2	3,4	97,2
5	226,0	231,5	8,1	2,6	102,4
6	348,0	339,5	12,2	2,6	97,5
7	146,0	152,5	8,3	1,3	104,4
8	166,0	159,9	10,0	3,8	96,3
9	476,0	468,6	11,5	2,0	98,5
10	414,0	420,7	12,3	2,2	101,6

Tabla 19. Predicción del contenido en ácido gentísico de muestras sintéticas de orina.

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	S _d	RES (%)	Recuperación (%)
1	180,0	185,6	7,3	3,9	103,1
2	386,0	375,5	8,9	3,1	97,3
3	346,0	353,5	8,4	2,9	102,2
4	82,0	77,6	7,9	3,7	94,6
5	138,0	134,3	5,4	2,6	97,3
6	178,0	171,9	7,8	2,5	96,6
7	454,0	445,9	6,5	1,4	98,2
8	110,0	106,2	6,0	3,5	96,5
9	214,0	221,4	8,1	2,0	103,4
10	304,0	304,1	8,4	2,2	100,0

Mediante mínimos cuadrados se ajustaron a líneas rectas los datos de las concentraciones predichas frente a las añadidas (figura 28). Asimismo, se representaron las regiones elípticas obtenidas considerando las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen a un nivel de confianza del 95% (figura 29).

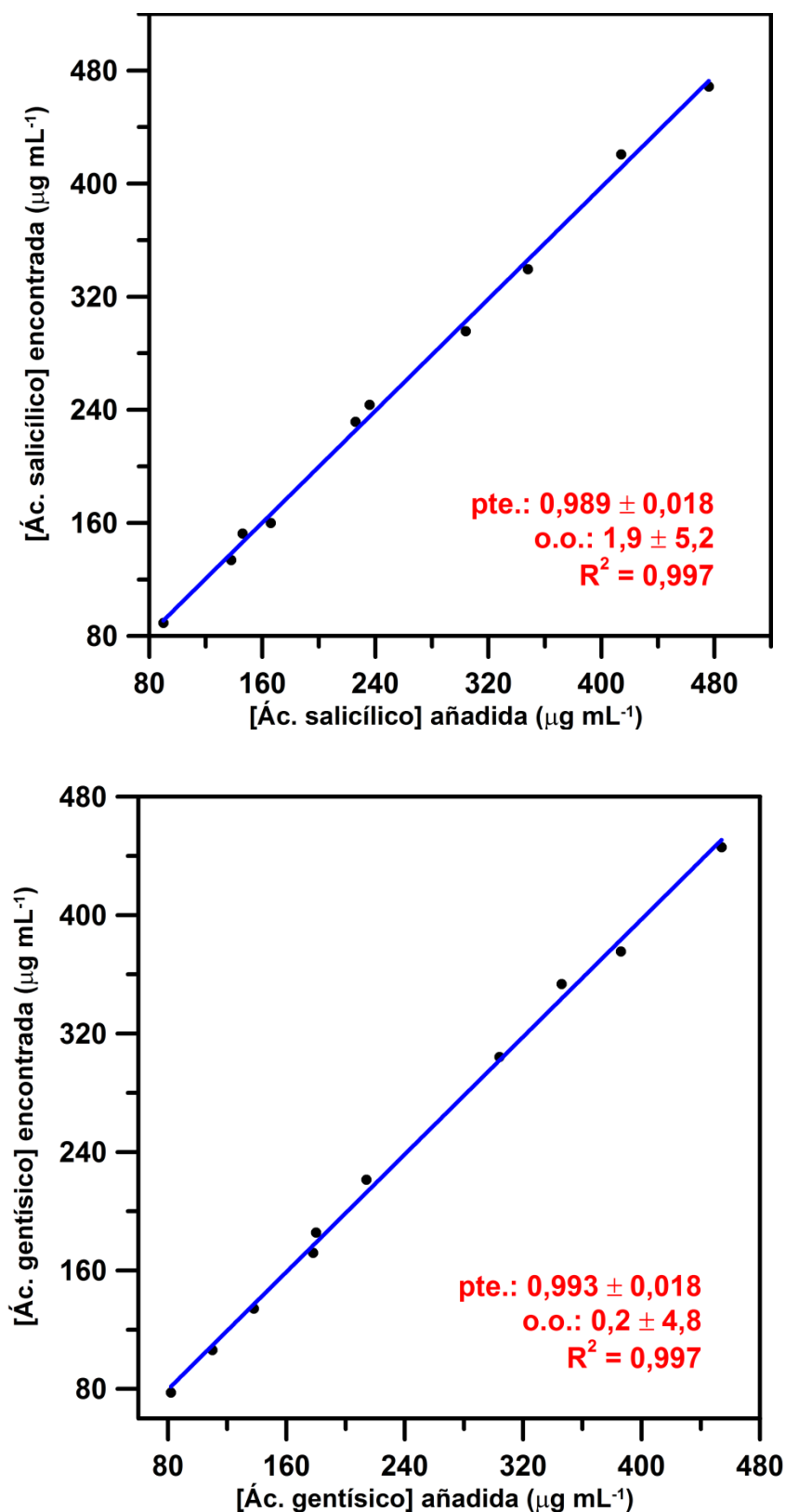


Figura 28. Representación gráfica de las concentraciones encontradas mediante el modelo PLS-1 frente a las añadidas para el ácido salicílico (arriba) y para el ácido gentísico (abajo) en orina, y ajuste a rectas mediante mínimos cuadrados.

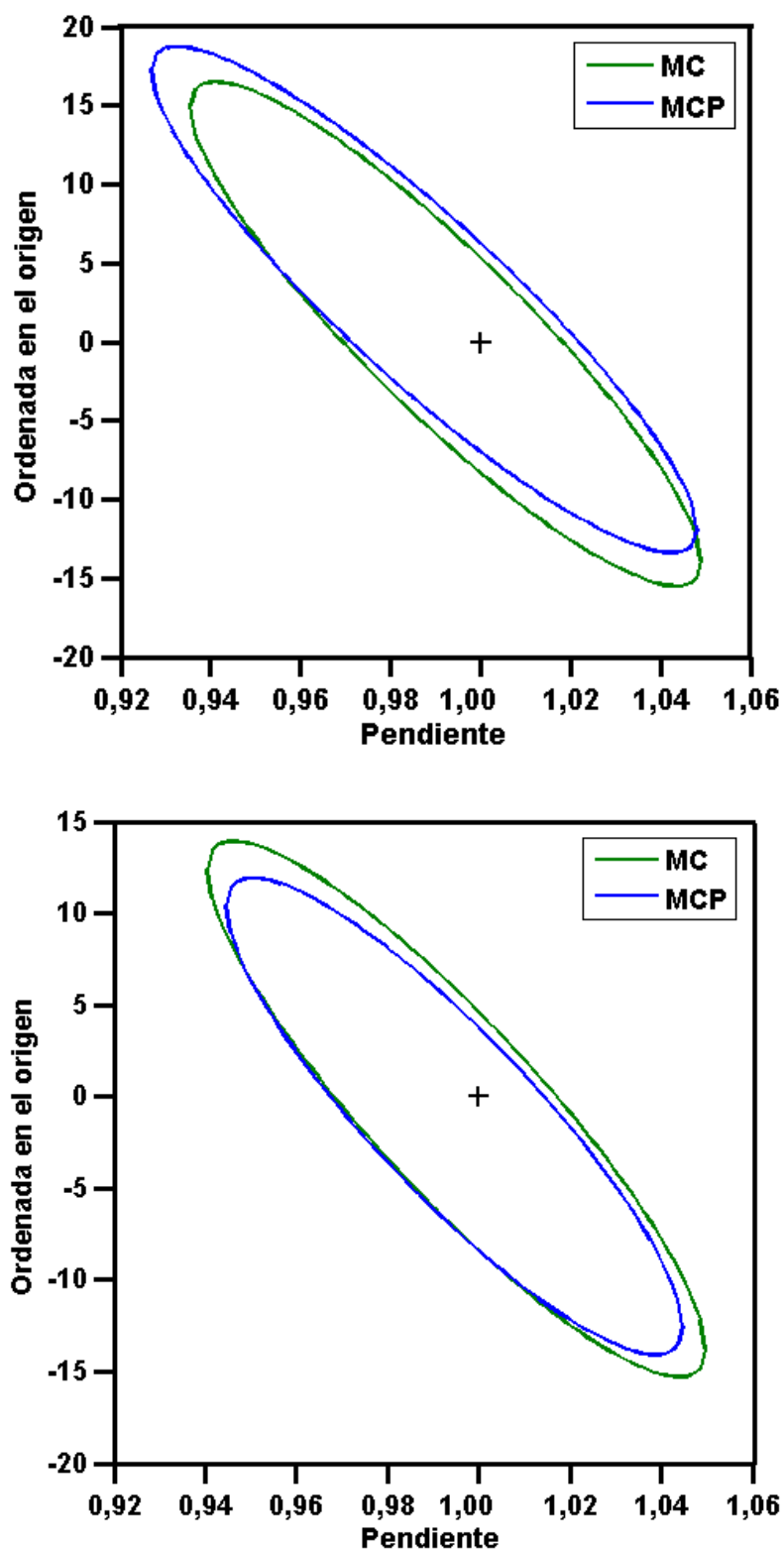


Figura 29. Región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen para el ácido salicílico (arriba) y para el ácido gentísico (abajo) en orina, considerando tanto una regresión mediante mínimos cuadrados (en verde), como mediante mínimos cuadrados ponderados (en azul).

Como puede constatar, las recuperaciones estuvieron muy próximas al 100% en todos los casos, las rectas de las concentraciones calculadas frente a las concentraciones añadidas tuvieron coeficientes de la determinación muy cercanos a la unidad y sus pendientes y ordenadas en el origen fueron indistinguibles de 1 y 0, respectivamente, a un nivel de confianza del 95% [275]. En conclusión, queda demostrado que el método propuesto es válido para la determinación simultánea de los ácidos salicílico y gentísico en muestras de orina, sin que el origen de ésta afecte a la determinación y sin necesidad de etapas previas de separación o de extracción.

Siguiendo el criterio desarrollado por nuestro grupo de investigación [224, 276], los límites de detección calculados para los dos metabolitos de la aspirina en orina son los recogidos en la tabla 20.

<i>Tabla 20. Cálculo de los límites de detección (LD) en orina.</i>			
Analito	S_b (µg L⁻¹)	b	LD (µg L⁻¹)
Ácido salicílico	2,6	1,0	7,9
Ácido gentísico	3,6	1,0	11,0

CHAPTER VIII

DUAL LIFETIME REFERENCED FLUOROMETRY FOR THE DETERMINATION OF DOXORUBICIN IN URINE

Abstract

Dual-Lifetime Referencing (DLR) is introduced as a rapid and self-referenced method for measuring the concentration of a fluorescent analyte in solution. The fluorescent cancer chemotherapeutic doxorubicin was chosen as a medically relevant analyte and blended with a reference dye (Ru(dpp)_3) that displays overlapping excitation and emission spectra. The relative amounts of the short-lived (nanoseconds) fluorescent analyte and the long-lived (microseconds) reference dye define the observed lifetime. Measuring this lifetime by both frequency-domain DLR and time-domain DLR yields similar analytical ranges and limits of detection (ca. $0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$). To assess the matrix effect of medical samples, the standard addition method was employed to both modes of DLR. Urine was spiked with doxorubicin and excellent recovery rates of $\geq 97\%$ were obtained.

1. Introduction

Most photometric measurements are self-referenced because the absorbance of an analyte can be determined by rationing the intensity of two light beams according to the Lambert-Beer law. By contrast, intensity-based fluorometry is much more sensitive than absorbance measurements but does not allow for a simple self-referencing scheme. The fluorescence intensity I_F in general depends on multiple parameters, which is evident from Parker's law (Equation 1):

$$I_F = I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l \cdot QY \cdot k \quad (1)$$

where I_0 is the intensity of the light source, ε the molar absorption coefficient of the analyte, c its concentration, l the length of the cuvette, QY the quantum yield, and k a geometrical factor. In particular, the intensity of the light source I_0 and the geometrical factor k , which includes e.g. the sensitivity of the photodetector, are prone to variations and cause errors in fluorometry. Such variations, however, usually do not affect the lifetime of a fluorophore and therefore fluorescence lifetime measurements are an established method, for instance, to distinguish between the emission of two distinct fluorescent labels in a protein. Lifetime measurements can either be performed in the frequency-domain or in the time-domain [437]. In the frequency domain, a fluorophore is excited with intensity-modulated light to yield an emission of the same frequency but with a delay (phase shift) that can be used to calculate [226, 438] the fluorescence lifetime τ according to the Equation 2:

$$\tau = \tan\Phi / 2\pi f_{\text{mod}} \quad (2)$$

with Φ being the phase shift between excitation and emission light, and f_{mod} the frequency of the modulated excitation light. This equation holds for single exponential decays. In time-domain lifetime measurements, a fluorophore is excited with a short

light pulse, and the emitted light is recorded and integrated in two separate time gates. Assuming a monoexponential decay of the fluorescence intensity, the lifetime τ is given [438] by the Equation 3:

$$\tau = (t_2 - t_1) / \ln(I_1/I_2) \quad (3)$$

where I_1 and I_2 are the integrated fluorescence intensities measured in time interval t_2 (gate 2) or in time interval t_1 (gate 1), respectively. Gate 1 and gate 2 must have the same integration times.

Dual-Lifetime Referencing (DLR) is an important implementation of lifetime measurements as it allows for self-referenced measurements [439, 440]. If a reference luminophore exhibiting a long lifetime of several microseconds is added to a short-lived fluorophore with a typical lifetime of a few nanoseconds, the observed lifetime depends on the relative concentrations of fluorophore and reference dye. The excitation and emission spectra of both dyes should overlap, so that they can be excited and monitored simultaneously. DLR was first developed to improve the performance of optical sensors for chloride [226] and pH values [206, 232]. These sensing applications require an indicator that changes its fluorescence in presence of the analyte while the luminophore provides a constant reference signal.

Here, DLR is employed for the first time to exploit the advantages of lifetime fluorometry for determining the concentration of intrinsically fluorescent analytes in solution, concretely the fluorescent anthracycline doxorubicin (Figure 1), which is an important cancer chemotherapeutic that is excreted in urine.

A relatively large number of methods to determinate doxorubicin in solution have been published previously, including voltammetry [441], fluorescence detection [442], capillary electrophoresis with UV detection [443] or laser-induced fluorescence detection [444-446], and high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection [447, 448], fluorescence detection [449-455], chemiluminescence detection [456, 457], electrochemical detection [458] or mass spectrometric detection [459-464].

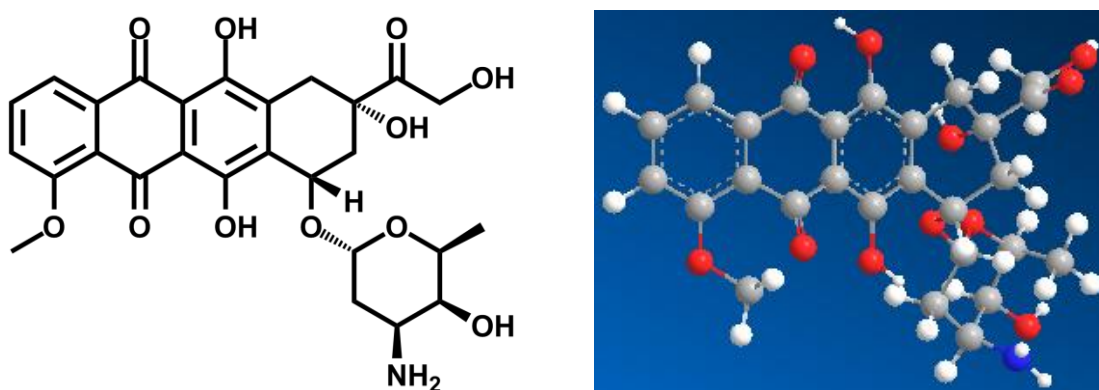


Figure 1. 2D and 3D molecular structures of doxorubicin.

2. Reagents and preparation of samples

Doxorubicin hydrochloride in a concentration of $300.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ was dissolved in doubly distilled water under stirring and ultrasonication for 30 minutes, and stored in the dark at 4°C .

The reference dye ruthenium(II)tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) (Ru(dpp)_3) (Figure 2) was incorporated into oxygen-impermeable polyacrylonitrile (PAN) nanoparticles to avoid quenching [465-467]: $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (4.0 mg) was dissolved in 3.1 mL of acrylonitrile (5 % w/v). The solution was added to 46.9 mL of degassed water containing 50 mg of potassium persulfate (0.1 % w/v) and 0.5 g of sodium dodecyl sulfate (1 % w/v). The solution was polymerized at 70°C to give nanoparticles of 120 nm diameter (see Figure 3). After 7 hours, the nanoparticles were centrifuged and washed for at least five times using doubly distilled water and ethanol to remove unreacted chemicals. Acrylonitrile should be handled with care since it is possibly carcinogenic [468]. A stock suspension of Ru(dpp)_3 particles (2.5 mg mL^{-1}) was prepared in doubly distilled water under stirring and 1 h of ultrasonication. The particle suspension was stored in the dark at 4°C .

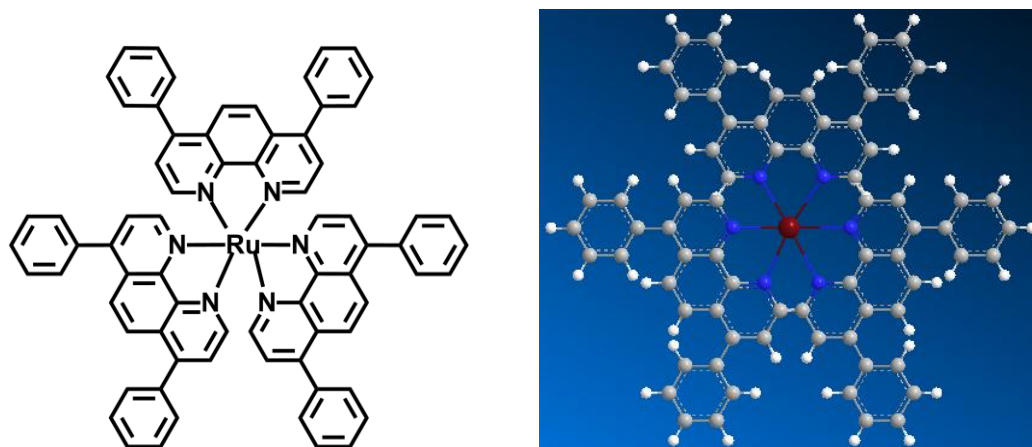


Figure 2. 2D and 3D molecular structures of $Ru(dpp)_3$.

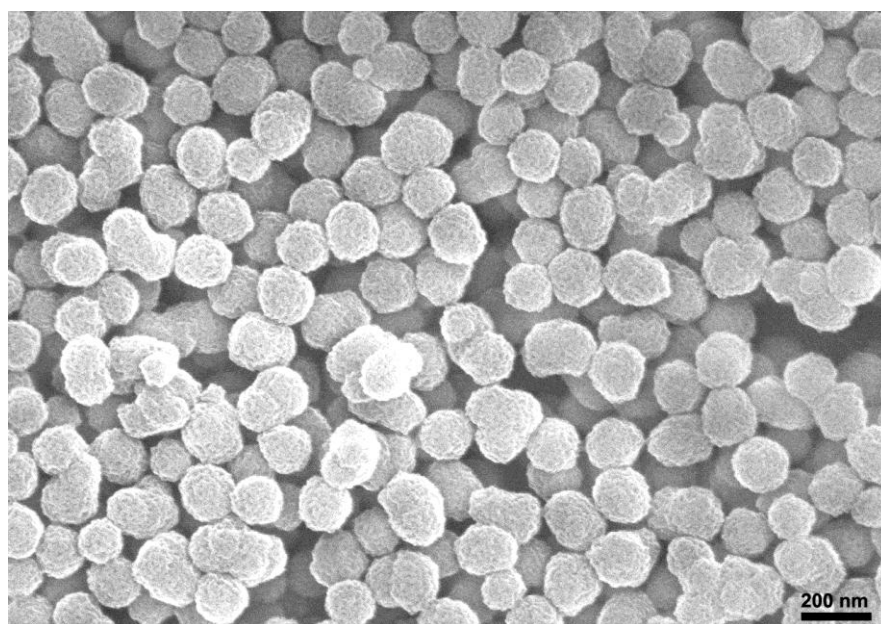


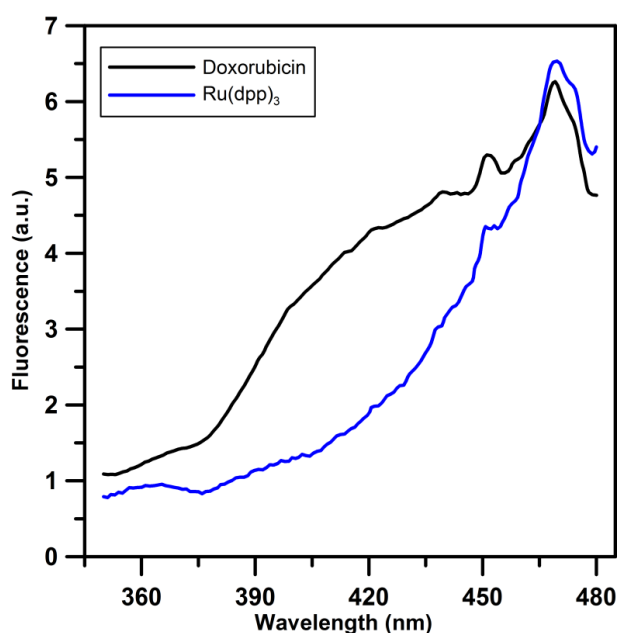
Figure 3. Transmission electron microscopy image of $Ru(dpp)_3$ -PAN particles.

3. Fluorescent characteristics of the analyte and the reference

Both frequency-domain and time-domain DLR depend on the use of a suitable reference dye that displays similar luminescent spectra and an at least 100 time longer emission lifetime than doxorubicin [226]. As Figure 4 shows, the excitation and the emission spectra of Ru(dpp)₃ overlap excellently with those of doxorubicin.

The fluorescence lifetime of doxorubicin can be considered as negligibly short compared to the long triplet-state lifetime of the reference luminophore Ru(dpp)₃. Thus, the concentration of doxorubicin in relation to Ru(dpp)₃ is indicated by the observed lifetime and accessible by both frequency-domain and time-domain DLR.

Ru(dpp)₃ exhibits a fairly high extinction coefficient (28600 L mol⁻¹ cm⁻¹) and quantum yield (0.366), a long lifetime (between 3.3 and 6.4 μs) and good photostability [206, 226, 232, 469-471]. Ru(dpp)₃ is hydrophobic and can be incorporated into PAN nanoparticles, which are impermeable to oxygen and protons [206, 232] and thus protect the Ru(dpp)₃ from quenching. Furthermore, the confinement of Ru(dpp)₃ inside the nanoparticles minimizes physical interaction with doxorubicin.



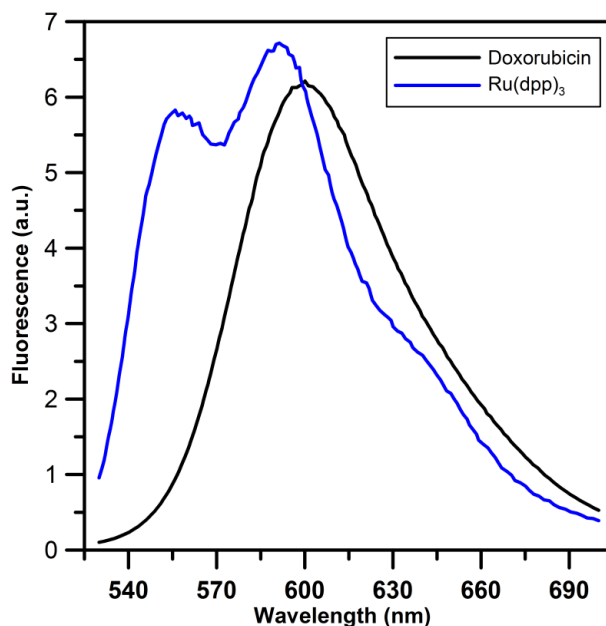


Figure 4. Doxorubicin (black line) and Ru(dpp)_3 enclosed in PAN nanoparticles (blue line) display overlapping excitation (up) and emission (down) spectra at $\text{pH} = 3.0$. The maxima in these fluorescence spectra are $\lambda_{\text{exc}} = 469 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 591 \text{ nm}$ for doxorubicin, and $\lambda_{\text{exc}} = 469 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ for $\text{Ru(dpp)}_3\text{-PAN}$.

4. Optimization of variables

4.1. Optimization of pH and buffer solution

In contrast to the particle-enclosed Ru(dpp)_3 , the fluorescence of dissolved doxorubicin is pH-dependent due to ionization at the glycosidic amine and the anthraquinone ring (Figure 1) [472]. The highest signal was obtained at $\text{pH} 3$ (see Figure 5), and all experiments were therefore carried out in citrate at this pH . A 0.5 mol L^{-1} citrate buffer stock solution, $\text{pH} 3.0$, was prepared and a citrate concentration of 0.1 mol L^{-1} in the working solutions proved to be enough to avoid pH changes due to variations in the concentration of doxorubicin or the ulterior presence of urine.

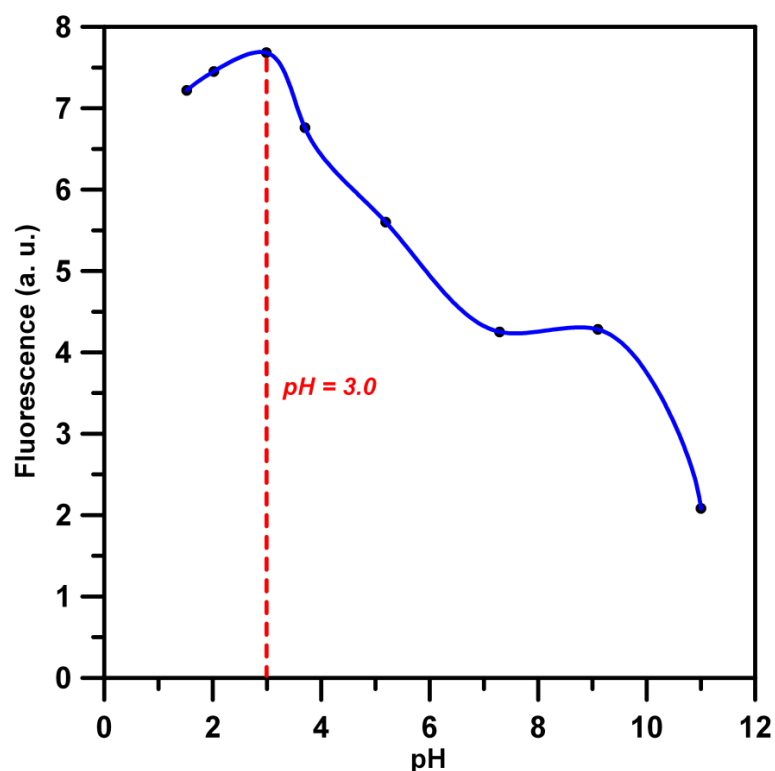


Figure 5. Variation of the fluorescent emission of doxorubicin with the pH of the solution.

4.2. Optimization of instrumental settings

4.2.1. Frequency-domain DLR

Frequency-domain fluorometry was performed using the handheld PDD-470 device (PreSens; www.presens.de), which contains all optical components for excitation, separating the light paths and detecting the fluorescence emission. The LED light source ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) was modulated with a frequency (f_{mod}) of 45 kHz. The optical fiber bundle coming from the device was introduced through a perforated plastic stopper into 600 μL -microtubes (see Figure 6). The end of the optical fiber always remained at a constant distance from the surface of the analyte solution. In order to maximize the fluorescence signal collected by the optical fiber and preclude external light, each microtube was covered with an aluminium foil.

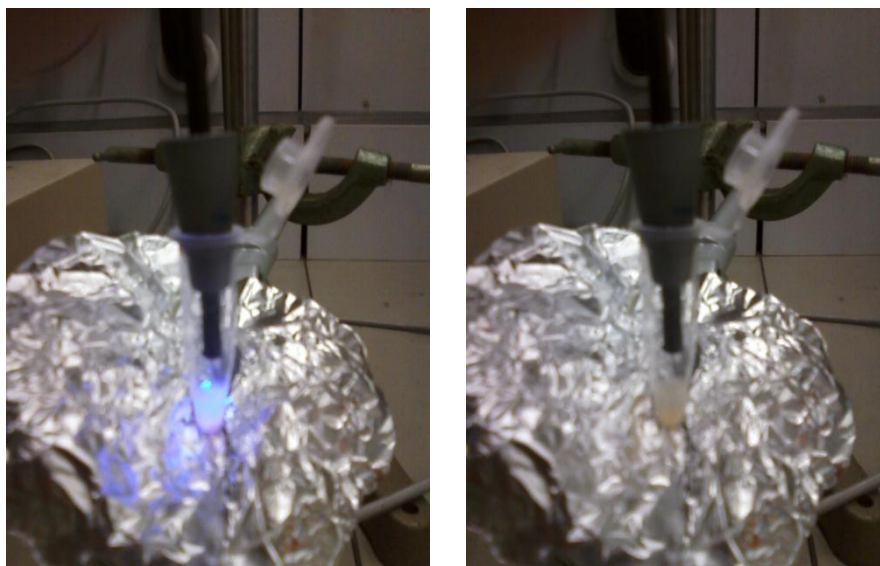


Figure 6. The light coming from the optical fiber bundle excites the sample contained inside the microtube and subsequently carries the fluorescent emission towards the detector.

Although the lifetime is independent of the concentration, the PDD-470 device required at least 1 mg mL^{-1} of Ru(dpp)_3 nanoparticles to obtain a constant and reproducible phase shift (see Figure 7). This concentration of 1 mg mL^{-1} was considered optimal because at higher concentrations the nanoparticles gradually precipitated from the suspension.

For measurements in the frequency-domain mode, various concentrations of doxorubicin were added to 1.0 mg mL^{-1} of Ru(dpp)_3 particles in citrate buffer, pH 3, and the volume was adjusted to $100.0 \text{ }\mu\text{L}$ with doubly distilled water. Shortly before the measurement, each microtube was closed and stirred vigorously for 10 s. The phase shift caused by each concentration of doxorubicin was measured over one minute, and ten measurements were averaged.

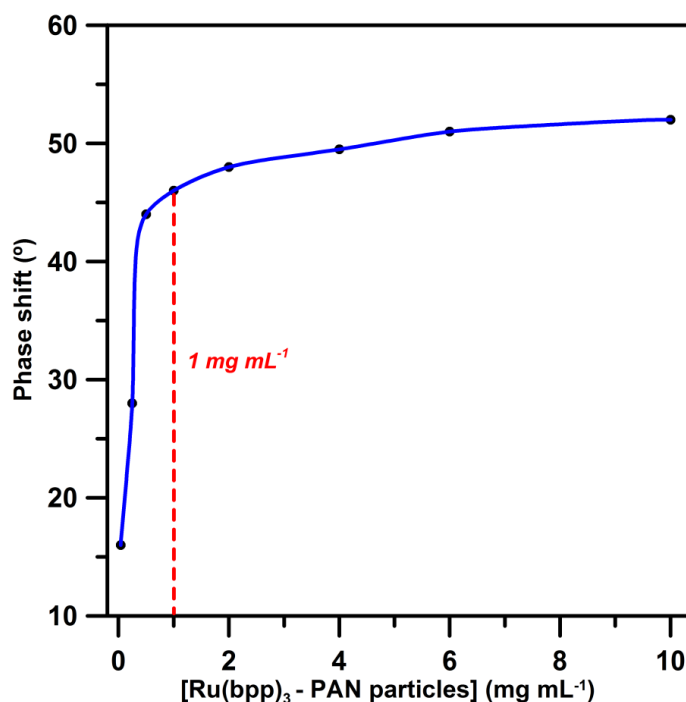


Figure 7. Phase shift measured by the PDD-470 device at different Ru(dpp)₃ - PAN particles concentrations.

4.2.2. Time-domain DLR

For time-domain DLR, doxorubicin was diluted serially in the wells of a 96 well microtiter plate containing a constant concentration of 0.04 mg mL⁻¹ reference particles (Ru(dpp)₃) in citrate buffer, pH 3, and the volume was adjusted in each well to 100.0 µL with doubly distilled water. The plate was placed in the dark and submitted to time-domain DLR using LED excitation ($\lambda = 460$ nm) (Luxeon V Star LXHL-LB5C 5W, Lumileds Lighting, www.philipslumileds.com). Time-gated luminescence intensities passed through a 530-nm long-pass optical filter and were recorded on an Image X Time Gated Imaging System (TGI; Photonic Research Systems; www.prsbio.com) with a 12-bit CCD chip (640x480 pixels). The combined luminescence intensity of doxorubicin and Ru(dpp)₃ was recorded and integrated at two time gates (each with an integration time of 9 µs) that were separated by a delay time of 0.25 µs. Each measurement was performed four times and the ratio of the integrated signals (gate 1 / gate 2) was calculated.

5. Calculation of the lifetime of the reference. Calibration

5.1. Frequency-domain DLR

The lifetime of particle-enclosed Ru(dpp)₃ was determined by using sinusoidally modulated light with a frequency (f_{mod}) of 45 kHz. Due to the long lifetime of the excited state, the emission appears with a phase shift of 46°, which corresponds to a lifetime of 3.7 μs (Equation 2) and is consistent with the literature [469-471].

At the same modulation frequency, the phase shift of doxorubicin is approximately 0° because this fluorophore has a lifetime of 1 ns [473, 474]. For DLR, various concentrations of doxorubicin were added to a constant concentration of particle-enclosed Ru(dpp)₃ (1 mg mL⁻¹) and their luminescence was modulated together. As the concentration of the reference dye was constant, an increasing concentration of the analyte doxorubicin led to a higher observed amplitude and a shift of the observed phase from 46° (no doxorubicin) to 0° (large excess of doxorubicin) (Figures 7 and 8).

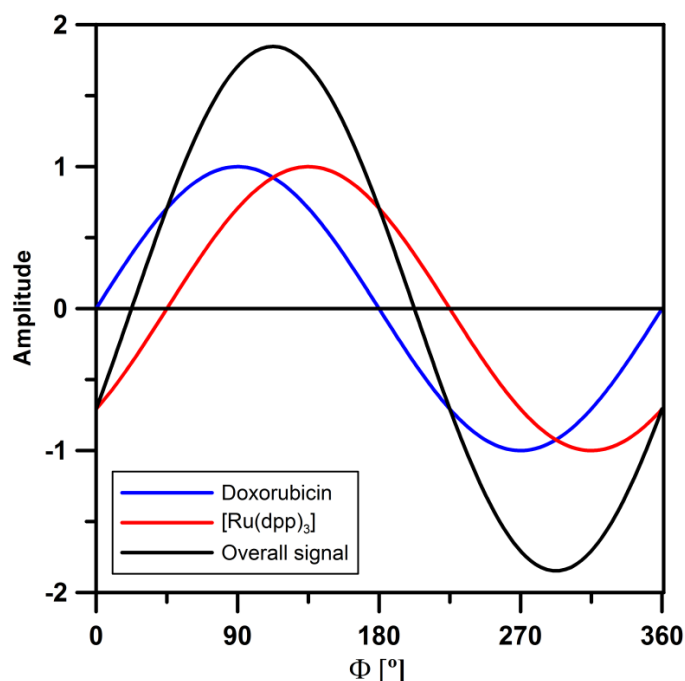


Figure 7. Schematic illustration of frequency-domain DLR: amplitude and phase shift (Φ) of the observed luminescence (black line), the luminescent reference dye Ru(dpp)₃ (red line), and the fluorescent analyte doxorubicin (black line).

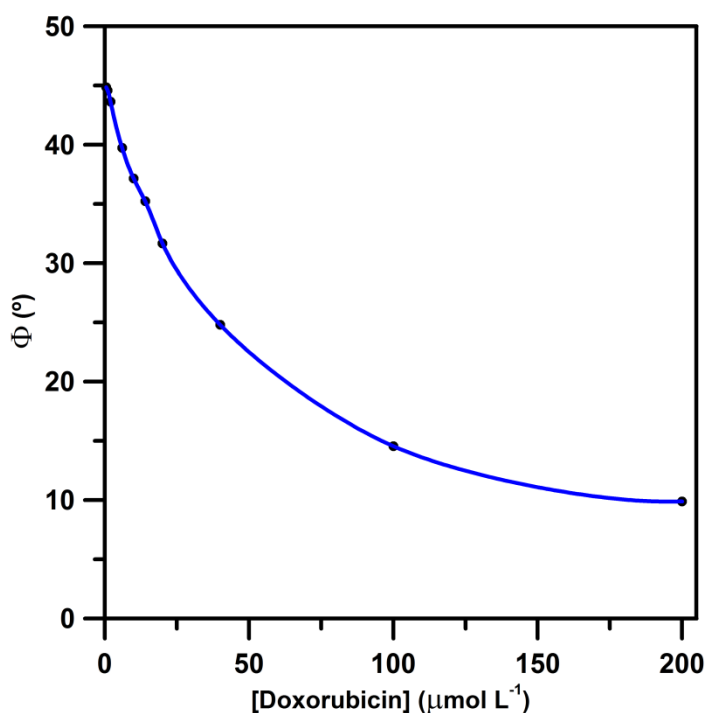


Figure 8. The phase shift (Φ) decreases if doxorubicin concentration increases.

This relationship is mathematically reflected by the equation 4 [226, 438]:

$$\frac{A_o \cos \Phi_o}{A_o \sin \Phi_o} = \cotan \Phi_o = \frac{A_{ref} \cos \Phi_{ref} + A_{an}}{A_{ref} \sin \Phi_{ref}} = \cotan \Phi_{ref} + \frac{1}{\sin \Phi_{ref}} \frac{A_{an}}{A_{ref}} \quad (4)$$

where A is the amplitude, and Φ is the phase shift of either the observed signal (o), the reference luminophore (ref), or the analyte (an). The cotangent of the phase shift ($\cotan \Phi_o$) depends on the ratio of the amplitudes of analyte and reference dye (A_{an}/A_{ref}). It is important to note that the phase shift is a self-referenced value that depends only on the concentration of the analyte and is not affected by possible variations in the intensity of the light source, the detector's sensitivity, sample turbidity, or geometrical variations.

A plot of $\cotan (\Phi)$ versus doxorubicin concentration is shown in Figure 9. A linear equation is obtained for concentrations lower than $100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ doxorubicin

with $\cotan(\Phi) = (286.0 \pm 3.0) \times 10^{-4} [\text{doxorubicin}] (\mu\text{mol L}^{-1}) + (1.008 \pm 0.010)$ ($R^2=0.9991$).

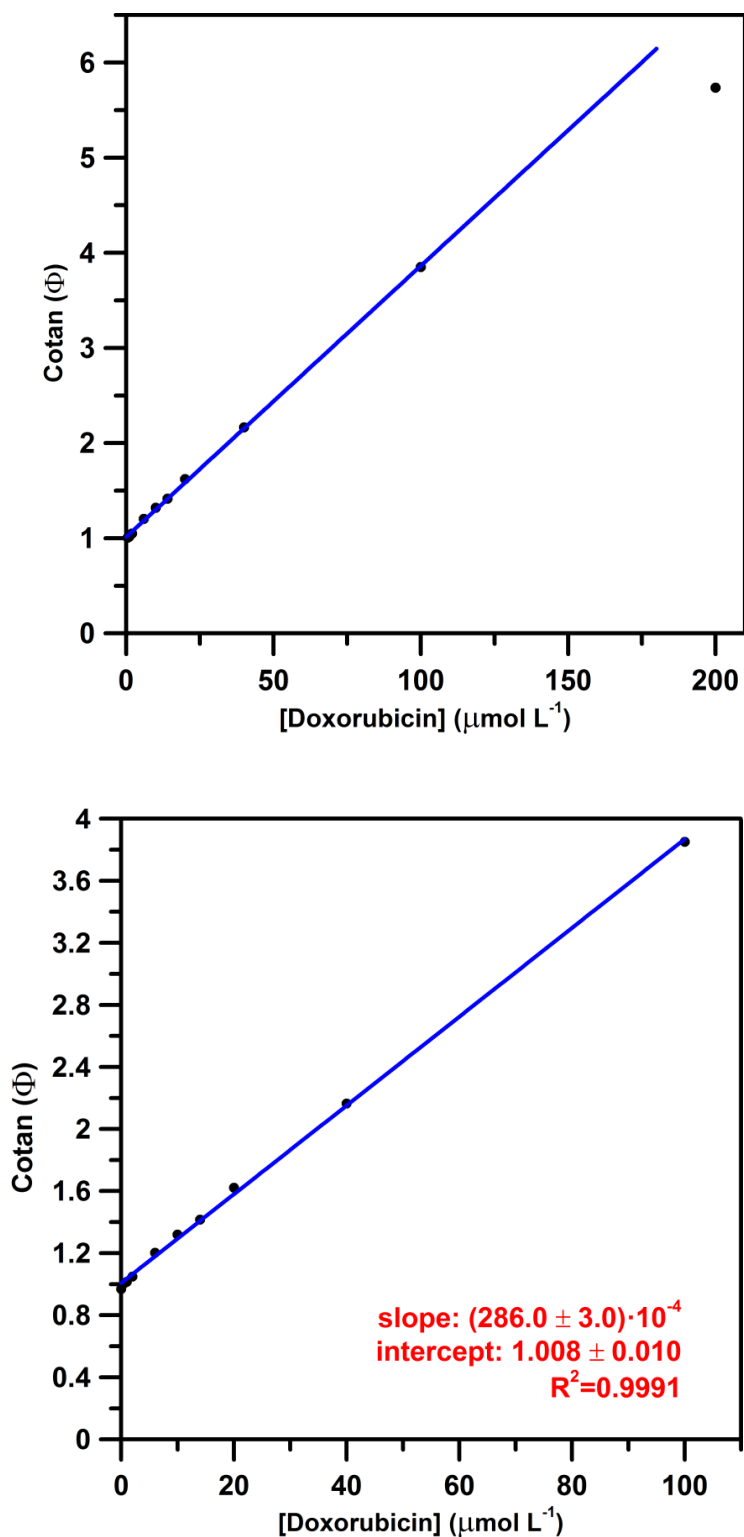


Figure 9. The analytical signal ($\cotan(\Phi)$) depends on the concentration of doxorubicin. Complete range in study (up) and linear range at low concentrations (down). The linear portion of the data ($\leq 100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ doxorubicin) is used for a least square fit.

The fluorescence of doxorubicin is quenched at higher concentrations, which has been attributed to molecular self-association [472]. The same quenching effect has also been described for similar compounds [475].

5.2. Time-domain DLR

The long lifetime of Ru(dpp)_3 facilitates time-gated measurements using a simple LED and a CCD camera. A detailed description of time-domain DLR was given previously [206] in the introduction chapter of this Thesis. After starting LED excitation at time point t_0 , the luminescence intensity of the Ru(dpp)_3 enclosed in PAN particles (0.04 mg mL^{-1}) was recorded and integrated from $t_1 = 1 \text{ }\mu\text{s}$ to $t_2 = 10 \text{ }\mu\text{s}$ (gate 1, *LED on*) and from $t_3 = 10.25 \text{ }\mu\text{s}$ to $t_4 = 19.25 \text{ }\mu\text{s}$ (gate 2, *LED off*) as shown in Figure 10:

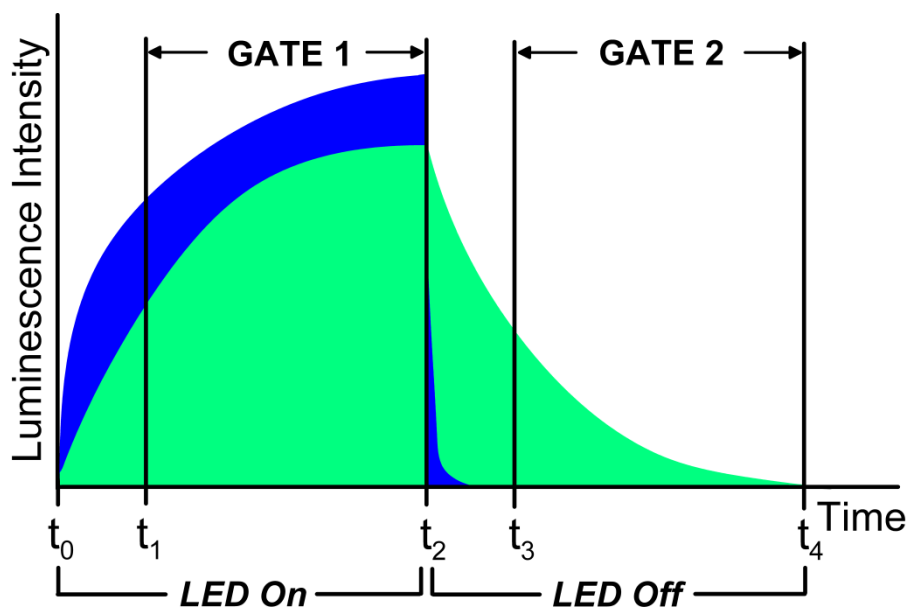


Figure 10. Schematic illustration of time-domain dual lifetime referencing. The fluorescence intensity of doxorubicin is shown in blue, and the luminescence intensity of Ru(dpp)_3 , which displays a much longer decay time, in green. $t_1 = 1 \text{ }\mu\text{s}$, $t_2 = 10 \text{ }\mu\text{s}$, $t_3 = 10.25 \text{ }\mu\text{s}$ and $t_4 = 19.25 \text{ }\mu\text{s}$.

By using Equation 3, a lifetime of 7.2 μs can be calculated. The same instrument settings were used to perform the DLR assay. Various concentrations of doxorubicin were added to 0.04 mg mL^{-1} of particle-enclosed Ru(dpp)_3 . The luminescence intensity was recorded and integrated in gate 1 to collect emission light from the short-lived doxorubicin and the long-lived Ru(dpp)_3 together. The excitation light was turned off at t_2 , after which the short-lived fluorescence emission of doxorubicin decayed completely within 250 ns. Thus, the luminescence intensity recorded and integrated in gate 2 originated from the long-lived Ru(dpp)_3 only. A constant concentration of Ru(dpp)_3 particles always yielded the same reference signal in gate 2, independent of the doxorubicin concentration. By contrast, the integrated signal in gate 1 increased linearly with the concentration of doxorubicin. Thus, the ratio (R) of gate 1 to gate 2 depends linearly on the concentration of the analyte in solution, as can be seen from Equation 5:

$$R = \frac{\text{Gate 1}}{\text{Gate 2}} = \frac{\text{Lum}_{\text{gate 1}}(\text{analyte}) + \text{Lum}_{\text{gate 1}}(\text{reference})}{\text{Lum}_{\text{gate 2}}(\text{reference})} \quad (5)$$

where Lum is the luminescence collected in gate 1 or gate 2, respectively. The ratio R is a self-referenced value that is not affected by possible variations in the LED light intensity or the sensitivity of the CCD camera.

The value of R (gate 1/gate 2) is plotted against the concentration of doxorubicin in Figure 11. A linear dependence is obtained for doxorubicin concentrations below 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with $\text{Ratio (gate 1/gate 2)} = (0.1460 \pm 0.0046) [\text{doxorubicin}] (\mu\text{mol L}^{-1}) + (3.76 \pm 0.075)$ ($R^2 = 0.992$). As described for frequency-domain DLR, the fluorescence is quenched at higher doxorubicin concentrations.

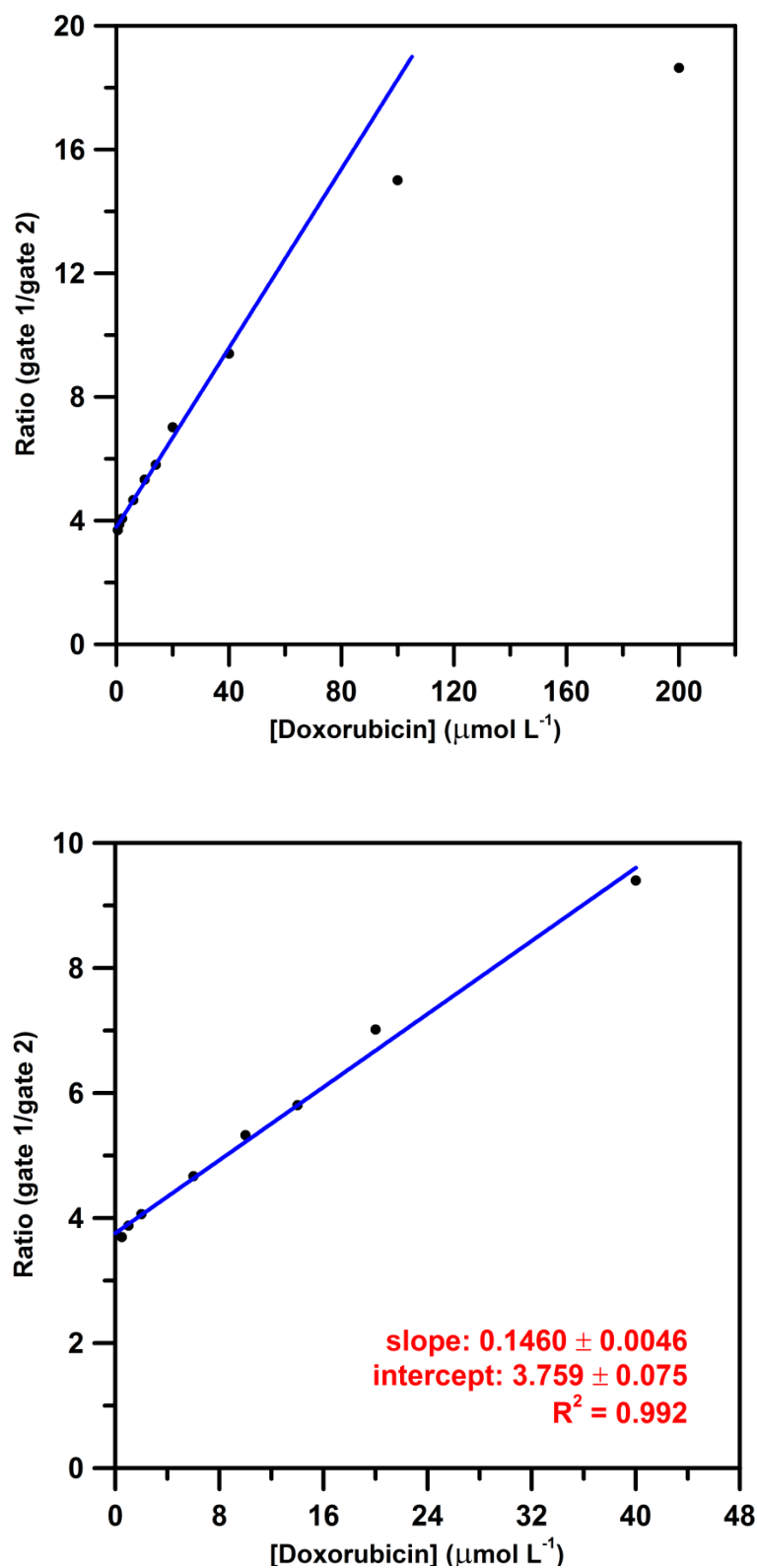


Figure 11. The analytical signal (ratio (gate1/gate2)) depends on the concentration of doxorubicin. Complete range in study (up) and linear range at low concentrations (down). The linear portion of the data ($\leq 40.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ doxorubicin) is used for a least square fit.

6. Limits of detection

Table 1 shows the limits of detection (LOD), which are calculated by using the IUPAC definition [240] with the Long and Winefordner recommendations [242]:

$$\text{LOD} = 3 S_b / b \quad (6)$$

where S_b is the standard deviation of the blank and b the slope of the calibration graph. The standard deviation of the blank was calculated from ten replicates. As Table 1 shows, the LODs calculated for both DLR modes are statistically undistinguishable.

<i>Table 1. Limits of detection (LOD).</i>			
DLR mode	S_b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	b	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Frequency-domain	$4.05 \cdot 10^{-3}$	$2.95 \cdot 10^{-2}$	0.41
Time-domain	$20.69 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-1}$	0.43

The determination of doxorubicin by HPLC in combination with mass spectrometry yielded the lowest LOD of 0.04 ng mL^{-1} (0.1 nmol L^{-1}) [461]. Such measurements, however, depend on expensive instrumentation and are costly to operate. By contrast, it is much simpler and less expensive to measure the intrinsic fluorescence of doxorubicin using either the handheld PDD-470 device for phase-domain DLR or a time-gated LED and CCD camera for time domain DLR. The most sensitive intensity-based measurements yielded an LOD of 32 ng mL^{-1} ($0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$) [442], which is about ten times lower than the results presented here for frequency-domain DLR and time-domain DLR. The fluorescence intensity, however, is not self-referenced and thus strongly depends on the experimental conditions, including the excitation light source and the detector sensitivity.

It is important to note that the DLR equipment used here originally was optimized for sensing applications with high concentrations of immobilized indicator and reference dyes for pH [206, 232] or chloride [226]. For these applications approximately equal amounts of fluorescent indicator and reference dye were used because the analyte is detected indirectly by quenching the luminescence of the indicator. Thus, a sensitive response of the indicator is more important than its LOD. If a stronger excitation source is used the fluorescence intensity increases and the concentrations of the analyte as well as the reference dye can be decreased. Consequently, lower LODs can be expected for both modes of DLR.

7. Determination of doxorubicin in urine

Doxorubicin usually is applied intravenously and later secreted with urine [476]. Consequently, the fluorometric analysis of doxorubicin in medically relevant samples may be affected by background fluorescence, especially from hemoglobin and its degradation product bilirubin that is also secreted in urine. Urine also displays intrinsic fluorescence [277], but not at the wavelengths used in the present work. We assessed the matrix effect of biological fluids on phase-domain and time-domain DLR by the standard addition method.

Urine was obtained from fasting healthy people and stored in the dark at 4°C. For determining the concentration of doxorubicin in urine, dilution series of the analyte were prepared in citrate buffer, pH 3.0, containing 40 % (v/v) of urine and the Ru(dpp)₃ reference particles in a total volume of 100.0 µL. Additionally, each sample was spiked with a fixed amount of 10.0 µmol L⁻¹ doxorubicin and increasing concentrations of the same analyte. Figure 11 shows the results of these analyses.

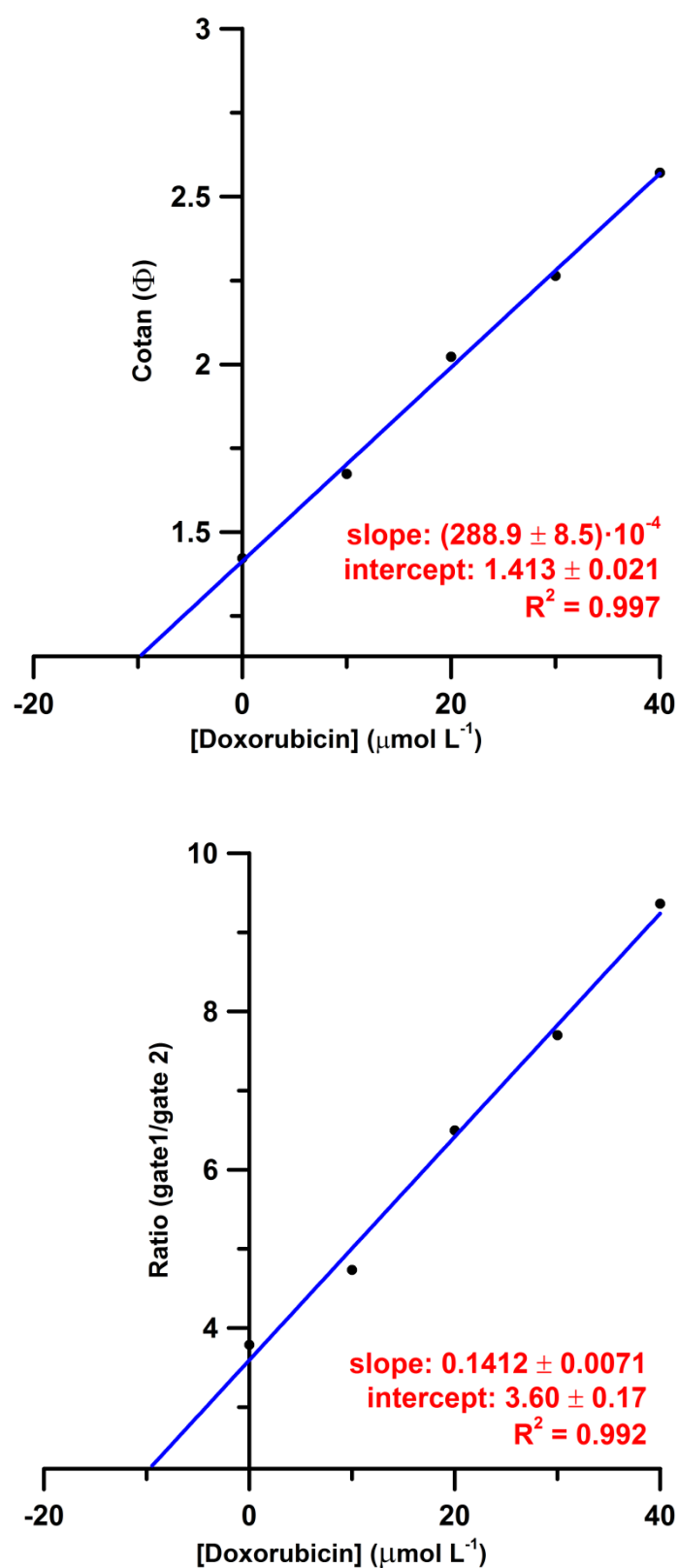


Figure 11. Standard addition technique for determining the concentration of doxorubicin in human urine by using frequency-domain DLR (up) and time-domain DLR (down). Each sample was spiked with $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of doxorubicin and contained 40 % (v/v) of urine. The blank value was chosen as the starting point for the y-axis to visualize the x-intercept at approximately $-10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Spiking with doxorubicin led to a higher intercept of the linear regression line. There was, however, no significant difference (F -test, $p = 0.62$ for frequency-domain DLR; $p = 0.64$ for time domain DLR) between the slopes obtained from pure doxorubicin and reference particles and those samples that contained 40 % (v/v) of urine as well as $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of spiked doxorubicin. This result demonstrates that both frequency-domain and time-domain DLR are largely resistant to the matrix effects of urine. Furthermore, high recovery rates of $\geq 97 \%$ were obtained in both modes of DLR (Table 2).

Table 2. Spiked and found concentrations of doxorubicin and recovery rates in urine resulting from the application of the standard addition method.

DLR mode	Spiked [doxorubicin] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Found [doxorubicin] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery (%)
Frequency-domain	10.0	9.8	97.9
Time-domain	10.0	9.7	97.1

In conclusion, both frequency-domain DLR and time-domain DLR are suitable for the determination of fluorescent analytes in biological fluids.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la investigación desarrollada en esta Memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los métodos basados en la luminiscencia sensibilizada por lantánidos resultan muy ventajosos debido a que la transferencia de energía entre los ligandos absorbentes y los iones de lantánidos dan lugar a una intensa y estrecha banda de emisión con un importante desplazamiento de Stokes y tiempos de vida de luminiscencia del orden de microsegundos. Este hecho posibilita la implementación de técnicas analíticas luminiscentes resueltas en el tiempo para la determinación de analitos muy poco fluorescentes en estado nativo. Estas nuevas técnicas son más selectivas y sensibles que los métodos luminiscentes clásicos basados en la medida de la intensidad.
2. La combinación de dicha técnica con el análisis multivariante de los datos de primer orden aportados por las curvas de decaimiento permite solventar la dificultad que supone la determinación simultánea de analitos cuyos complejos con lantánidos presentan un completo solapamiento espectral. De esta forma, se han determinado doxicilina y clortetraciclina, complejadas con europio, tanto en preparados farmacéuticos como en muestras de orina.
3. Asimismo, la determinación de mezclas binarias de fenamatos en preparados farmacéuticos utilizando los tiempos de vida de sus complejos con terbio como dato discriminatorio en calibración multivariante también presenta características analíticas altamente satisfactorias. Si bien la capacidad predictiva del método disminuye en presencia de orina, el análisis de varianza aplicado a las rectas obtenidas al representar las concentraciones predichas frente a las concentraciones adicionadas evidencia que el efecto matriz es independiente del origen de la orina. Este hecho corrobora la validez de dichas rectas para la determinación de fenamatos

- en fluidos biológicos, con la ventaja adicional de no requerir de tratamientos o separaciones previas.
4. Se ha desarrollado un algoritmo de optimización basado en la combinación del método del simplex modificado de Nelder y Mead con el método del centroide ponderado. A continuación, se ha aplicado considerando como objetivo la maximización de la relación señal/ruido, consiguiéndose resultados excelentes con un número de experimentos inferior al necesario para llevar a cabo la optimización secuencial de las diferentes variables instrumentales.
 5. El análisis multivariante de las curvas de decaimiento fluorescente registradas tras excitar los analitos con un láser de nitrógeno permite la determinación simultánea de metabolitos con características luminiscentes muy similares en matrices complejas que presentan fuertes interferencias, sin necesidad de realizar tratamientos previos sobre las muestras, siempre y cuando se seleccione adecuadamente la matriz de calibración. De este modo se ha resuelto satisfactoriamente la mezcla de dos de los metabolitos principales del ácido acetil salicílico, los ácidos salicílico y genticónico, tanto en preparados farmacéuticos como en orina.
 6. Análogamente se han podido determinar simultáneamente la nabumetona y su principal metabolito, el 6-MNA, cuyo solapamiento espectral es completo, en fármacos que contienen nabumetona como principio activo. A pesar del solapamiento existente entre los espectros de la orina y los analitos, la determinación del 6-MNA no se ve afectada por la presencia de la matriz. No obstante, es necesario la utilización de la técnica de las adiciones estándar para la eliminación de la influencia de la matriz en la determinación de nabumetona, puesto que su tiempo de vida está mucho más próximo al de la orina.
 7. Por último, “Dual-Lifetime Referencing” (DLR), tanto en el campo de frecuencias como en el campo de tiempos, ha demostrado ser una técnica adecuada para la determinación de analitos fluorescentes, como la doxorubicina, en fluidos biológicos, siempre que se encuentren moléculas de referencia que presenten

espectros de excitación y emisión solapados con los del analito, así como tiempos de vida luminiscente mucho más largos. Estos métodos de patrón interno resueltos en el tiempo evitan errores debido a variaciones instrumentales y son, por tanto, más fiables que los métodos clásicos basados en la medida de la intensidad luminiscente. Además, el método desarrollado puede aplicarse a la determinación fluorométrica de otros analitos fluorescentes, siempre y cuando se disponga de partículas de una referencia que presente espectros de excitación y emisión similares y un tiempo de vida mucho más largo que el del analito.

CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the experimental results:

1. Lanthanide-sensitized luminescence methods are extremely advantageous because the transference of energy from the organic ligands to the lanthanide ions yields intense and narrow emission peaks with long both Stokes shifts and lifetimes (microseconds). This fact allows the implementation of time-resolved luminescence analytical techniques to determinate molecules that show negligible native luminescence. These methods are more selective and sensitive than classic intensity based fluorometry.
2. The combination of this technique with the multivariate analysis of first order decay curves enables the simultaneous determination of analytes, the lanthanide complexes of which show complete overlapping spectra. In this way, doxycycline and chlortetracycline, complexed with europium, have been determined, both in medicines and urine samples.
3. Moreover, the determination of binary mixtures of fenamates in pharmaceutical preparations shows highly satisfactory analytical results thanks to the use of the different lifetimes of their terbium complexes in multivariate calibration to distinguish between both analytes. Although the prediction ability of the method decreases in urine samples, the analysis of variance of the graphs of predicted versus actual concentrations makes clear that the matrix effect is independent from the urine source. This fact proves the validity of these graphs to determinate fenamates in biological fluids, without separation or pre-treatment steps as additional advantages.
4. An optimization algorithm based on the combination of the Modified Simplex Method by Nelder and Mead and the Centroid-Weighted Modified Simplex

Method has been tested. The excellent experimental results show the advantages of this method compared to the sequential optimization, since the former requires a lower number of experiments and therefore is faster and cheaper.

5. The multivariate analysis of laser-induced fluorescence decay curves allows the simultaneous determination of metabolites with similar luminescent characteristics, even in complex matrices that cause massive interferences. Pre-treatments or previous separations are not needed whenever calibration matrices are correctly designed. In this way, two major metabolites of acetyl salicylic acid - salicylic and gentisic acids - have been simultaneously determined, both in pharmaceutical preparations and in human urine samples.
6. Analogously, and in spite of showing spectra that overlap completely, nabumetone and its main metabolite, 6-MNA, have been successfully quantified at the same time in medicines containing nabumetone. Although the spectra of human urine overlap as well with those of the analytes, the determination of 6-MNA is not affected by the presence of the matrix. However, the standard addition technique is needed to overcome the negative influence of the urine in the determination of nabumetone. These facts are due to the proximity of fluorescence lifetime values of nabumetone and urine, whereas the lifetime of 6-MNA is relatively longer.
7. Finally, Dual-Lifetime Referencing (DLR), in both frequency-domain and time-domain modes, is suitable for the determination of intrinsic fluorescent analytes, such as doxorubicin, in biological fluids, providing that reference particles with similar excitation and emission spectra and much longer decay times are available. These self-referenced lifetime measurements avoid errors due to instrumental variations and therefore are more reliable than intensity-based measurements. Moreover, the method could also be applied to the ratiometric fluorometric determination of any other intrinsically fluorescent analyte if reference particles with similar excitation and emission spectra and long decay times are available.

REFERENCIAS

Referencias

- [1] **G. G. Stokes (1852)** *Philosophical Transactions*, 142 (463-562).
- [2] **P. J. Macquer (1779)** *Dictionnaire de Chymie* (462).
- [3] **P. J. Macquer (1779)** *Dictionnaire de Chymie* (464).
- [4] **M. Robbins (1994)** *Fluorescence. Gems and Minerals under Ultraviolet Light*, Geoscience Press
- [5] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina (1993)** *Computers & Chemistry*, 17 (341-354).
- [6] **S. I. Weissman (1942)** *Journal of Chemical Physics*, 10 (214-217).
- [7] **G. A. Crosby, R. E. Whan, R. M. Alire (1961)** *The Journal of Chemical Physics*, 34 (743-748).
- [8] **R. E. Whan, G. A. Crosby (1962)** *Journal of Molecular Spectroscopy*, 8 (315-327).
- [9] **R. P. Fisher, J. D. Winefordner (1971)** *Analytical Chemistry*, 43 (454-455).
- [10] **H. G. Brittain (1979)** *Analytica Chimica Acta*, 106 (401-403).
- [11] **F. J. Gustafson, J. C. Wright (1979)** *Analytical Chemistry*, 51 (1762-1774).
- [12] **S. Yamada, K. Kano, T. Ogawa (1982)** *Analytica Chimica Acta*, 134 (21-29).
- [13] **S. Yamada, F. Miyoshi, K. Kano, T. Ogawa (1981)** *Analytica Chimica Acta*, 127 (195-198).
- [14] **S. S. Hassan, W. H. Mahmoud (1982)** *Analytical Chemistry*, 54 (228-231).
- [15] **T. Taketatsu (1982)** *Talanta*, 29 (397-400).
- [16] **N. Arnaud, J. Georges (1997)** *The Analyst*, 122 (143-146).
- [17] **L. M. Hirschy, E. V. Dose, J. D. Winefordner (1983)** *Analytica Chimica Acta*, 147 (311-316).
- [18] **A. Albert, C. W. Rees (1956)** *Nature*, 177 (433-434).
- [19] **J. Georges, S. Ghazarian (1993)** *Analytica Chimica Acta*, 276 (401-409).
- [20] **R. D. Jee (1995)** *The Analyst*, 120 (2867-2872).
- [21] **N. Arnaud, J. Georges (2001)** *The Analyst*, 126 (694-697).
- [22] **G. Y. Chen, M. J. Schneider, A. M. Darwish, S. J. Lehotay, D. W. Freeman (2004)** *Talanta*, 64 (252-257).
- [23] **M. C. Mahedero, D. Bohoyo, F. Salinas, T. Ardila, D. Airado, B. Roldán (2005)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (1101-1104).
- [24] **G. A. Ibáñez (2008)** *Talanta*, 75 (1028-1034).
- [25] **G. Y. Chen (2008)** *Sensors and Actuators, B*, b130 (750-757).
- [26] **C. L. Kuong, T. J. Yu, Y. C. Chen (2009)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (1433-1439).
- [27] **D. D. Li, J. X. Du, J. R. Lu (2008)** *Microchimica Acta*, 161 (169-173).

- [28] **S. M. Z. Al-Kindy, A. Al-Wishahi, F. E. O. Suliman (2004)** *Talanta*, 64 (1343-1350).
- [29] **P. Izquierdo, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1994)** *Analytica Chimica Acta*, 292 (133-139).
- [30] **P. Izquierdo, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1994)** *Analytical Letters*, 27 (2303-2316).
- [31] **B. Sendra, S. Panadero, A. Gómez Hens (1999)** *Analytical Letters*, 32 (1835-1846).
- [32] **S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1997)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357 (80-83).
- [33] **S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1995)** *Analytica Chimica Acta*, 303 (39-45).
- [34] **S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1996)** *Analytica Chimica Acta*, 329 (135-141).
- [35] **B. Sendra, S. Panadero, A. Gómez Hens (1997)** *Analytica Chimica Acta*, 355 (145-150).
- [36] **S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1998)** *Talanta*, 45 (829-834).
- [37] **M. P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito (1999)** *The Analyst*, 124 (1079-1084).
- [38] **S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Díaz (2008)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (715-719).
- [39] **P. C. Ioannou, N. V. Rusakova, D. A. Andrikopoulou, K. M. Glynou, G. M. Tzompanaki (1998)** *The Analyst*, 123 (2839-2843).
- [40] **N. Arnaud, J. Georges (2003)** *Analytica Chimica Acta*, 476 (149-157).
- [41] **N. Arnaud, J. Georges (1999)** *The Analyst*, 124 (1075-1078).
- [42] **S. Rabouan, E. Barron, B. Legube (2004)** *Analytical Letters*, 37 (131-142).
- [43] **S. Rabouan, G. Macouin, P. Prognon, D. Barthes (2001)** *Analytical Letters*, 34 (2321-2334).
- [44] **M. A. Fotopoulou, P. C. Ioannou (2002)** *Analytica Chimica Acta*, 462 (179-185).
- [45] **A. Andreu Navarro, J. M. Fernández Romero, A. Gómez Hens (2010)** *Journal of Separation Science*, 33 (509-515).
- [46] **A. Rieutord, P. Prognon, G. Mahuzier (1996)** *Analisis*, 24 (349-360).
- [47] **A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier (1997)** *The Analyst*, 122 (59R-66R).
- [48] **M. Shaghaghi, J. L. Manzoori, A. Jouyban (2008)** *Food Chemistry*, 108 (695-701).
- [49] **A. M. Casas Hernández, M. P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens (2003)** *Analytical Letters*, 36 (1017-1027).
- [50] **A. Ruíz Medina, M. L. Fernández de Córdova, E. J. Llorent Martínez, L. Molina García (2009)** *Talanta*, 79 (627-632).
- [51] **A. Rieutord, L. Vázquez, M. Soursac, P. Prognon, J. Blais, P. Bourget, G. Mahuzier (1994)** *Analytica Chimica Acta*, 290 (215-225).

- [52] **C. J. Veiopoulou, P. C. Ioannou, E. S. Lianidou (1997)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15 (1839-1844).
- [53] **J. A. Hernández Arteseros, R. Compano, M. D. Prat (1998)** *The Analyst*, 123 (2729-2732).
- [54] **J. A. Ocaña, M. Callejón, F. J. Barragán (2000)** *The Analyst*, 125 (1851-1854).
- [55] **J. A. Ocaña, M. Callejón, F. J. Barragán (2001)** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (1553-1557).
- [56] **J. Q. Liu, X. Wang, H. C. Zhao (2001)** *Fenxi Shiyanshi*, 20 (79-82).
- [57] **X. Wang, H. C. Zhao, L. H. Nie, L. P. Jin, Z. L. Zhang (2001)** *Analytica Chimica Acta*, 445 (169-175).
- [58] **S. L. Chen, H. C. Zhao, C. Y. Sun, N. Lian, L. P. Jin (2002)** *Analytical Letters*, 35 (1705-1714).
- [59] **N. Lian, C. Y. Sun, H. C. Zhao (2002)** *Fenxi Kexue Xuebao*, 18 (111-114).
- [60] **H. C. Zhao, R. Q. Feng, X. B. Wang, L. Yi (2002)** *Fenxi Shiyanshi*, 21 (1-4).
- [61] **L. H. Nie, H. C. Zhao, X. Wang, L. Yi, Y. Lu, L. P. Jin, H. M. Ma (2002)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374 (1187-1190).
- [62] **R. M. Cuenca Trujillo, M. J. Ayora Canad , A. Molina Díaz (2002)** *Journal of AOAC International*, 85 (1268-1272).
- [63] **N. Lian, H. C. Zhao, C. Y. Sun, S. L. Chen, Y. Lu, L. P. Jin (2003)** *Microchemical Journal*, 74 (223-230).
- [64] **J. A. Ocaña, M. Callejón, F. J. Barragán, F. F. de la Rosa (2003)** *Analytica Chimica Acta*, 482 (105-113).
- [65] **J. A. Ocaña, F. J. Barragán, M. Callejón (2004)** *Talanta*, 63 (691-697).
- [66] **S. Chen, H. W. Ma, H. C. Zhao, R. Q. Feng, L. P. Jin (2004)** *Analytical Sciences*, 20 (1075-1078).
- [67] **E. J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz (2005)** *Analytical Biochemistry*, 347 (330-332).
- [68] **X. L. Wang, S. L. Chen, H. C. Zhao, L. P. Jin, X. Li (2005)** *Analytical Letters*, 38 (971-979).
- [69] **E. J. Llorent Martínez, J. F. García Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz (2005)** *Analytica Chimica Acta*, 532 (159-164).
- [70] **Y. Liu, S. L. Chen, H. C. Zhao, L. P. Jin (2005)** *Analytical Sciences*, 21 (373-375).
- [71] **N. Lian, J. C. Wang, W. H. Leng, X. J. Chang (2005)** *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, 25 (1038-1041).
- [72] **H. Y. Li, L. Wang, J. F. Ma, C. C. Guo, W. Jiang (2006)** *Fenxi Huaxue*, 34 (207-210).
- [73] **X. L. Wang, B. Shen, H. C. Zhao, L. P. Jin (2007)** *Analytical Sciences*, 23 (1373-1376).
- [74] **F. S. Yu, D. Z. Zhou, K. B. Wu, F. Chen. (2008)** *Analytical Letters*, 41 (3124-3137).

- [75] **E. J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, A. Ruíz Medina (2008)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (1397-1403).
- [76] **J. J. Li, Z. L. Zhang, L. B. Qu, R. Yang (2009)** *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 29 (73-77).
- [77] **X. L. Wang, A. Y. Li, H. C. Zhao, L. P. Jin (2009)** *Journal of Analytical Chemistry (Translation of Zhurnal Analiticheskoi Khimii)*, 64 (75-81).
- [78] **V. A. Lozano, R. Tauler, G. A. Ibáñez, A. C. Olivieri (2009)** *Talanta*, 77 (1715-1723).
- [79] **Y. H. Chen, F. L. Zhao, Y. Q. Zhang, B. S. Liu (2009)** *Fenxi Shiyanshi*, 28 (24-26).
- [80] **V. A. Lozano, G. A. Ibáñez, A. C. Olivieri (2010)** *Analytical Chemistry*, 82 (4510-4519).
- [81] **F. S. Yu, L. Li, F. Chen, W. Z. Liu (2010)** *Analytical Letters*, 43 (357-366).
- [82] **W. Jiang, Y. D. Ma, W. Y. Zhao, Y. Feng, N. X. Wang, Z. K. Si (2003)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (681-684).
- [83] **Y. H. Chen, F. L. Zhao, Y. Q. Zhang, Y. K. Lu, B. S. Liu (2009)** *Fenxi Shiyanshi*, 28 (31-33).
- [84] **T. Zhang, P. Y. Feng, Q. W. Liu, G. H. Li (2011)** *Fenxi Shiyanshi*, 30 (69-72).
- [85] **A. Gómez Hens, M. P. Aguilar Caballos (2002)** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (131-141).
- [86] **G. M. Hieftje, D. S. Hanselman, P. P. Mahoney, N. N. Sesi, K. E. Shanks, S. E. Hobbs, D. L. Burden (1995)** *Mikrochimica Acta*, 120 (3-9).
- [87] **G. J. Blanchard (2001)** *Applied Spectroscopy*, 55 (110A-118A).
- [88] **E. P. Diamandis (1993)** *Analytical Chemistry*, 65 (454R-459R).
- [89] **F. V. Bright, R. Wang, J. S. Lundgren (1997)** *Applied Spectroscopy Reviews*, 32 (1-3).
- [90] **L. J. Kricka, P. E. Stanley (1999)** *Luminescence*, 14 (47-61).
- [91] **D. Phillips (1994)** *The Analyst*, 119 (543-550).
- [92] **T. Iwata, M. Senda, Y. Kurosu, A. Tsuji, M. Maeda (1997)** *Analytical Chemistry*, 69 (1861-1865).
- [93] **M. R. Wing, E. J. Stromvall, S. H. Lieberman (1990)** *Marine Chemistry*, 29 (325-338).
- [94] **K. J. Miller, I. Leesong, J. Bao, F. E. Regnier, F. E. Lytle (1993)** *Analytical Chemistry*, 65 (3267-3270).
- [95] **J. Rabina, P. Mattila, R. Renkonen (2000)** *Analytical Biochemistry*, 286 (173-178).
- [96] **D. E. Biazzo-Ashnault, Y. W. Park, R. T. Cummings, V. Ding, D. E. Moller, B. B. Zhang, S. A. Qureshi (2001)** *Analytical Biochemistry*, 291 (155-158).
- [97] **Y. Kawabata, K. Sauda, T. Imasaka, N. Ishibashi (1988)** *Analytica Chimica Acta*, 208 (255-262).
- [98] **W. Becker, H. Hickl, C. Zander, K. H. Drexhage, M. Sauer, S. Siebert, J. Wolfrum (1999)** *Review of Scientific Instruments*, 70 (1835-1841).
- [99] **A. Oser, M. Collasius, G. Valet (1990)** *Analytical Biochemistry*, 191 (295-301).

- [100] N. M. Grubor, R. Shinar, R. Jankowiak, M. D. Porter, G. J. Small (2004) *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (547-556).
- [101] Y. X. Ci, Y. Z. Li, X. J. Liu (1995) *Analytical Chemistry*, 67 (1785-1788).
- [102] M. Neumann, D.-P. Herten, A. Dietrich, J. Wolfrum, M. Sauer (2000) *Journal of Chromatography*, 871 (299-310).
- [103] X. J. Liu, Y. Z. Li, Y. X. Ci (1997) *Analytica Chimica Acta*, 345 (213-217).
- [104] J. P. Knemeyer, D. P. Herten, M. Sauer (2003) *Analytical Chemistry*, 75 (2147-2153).
- [105] C. E. Bush, M. L. J. Di, W. R. Peterson, D. G. Sherman, J. H. Godsey (1992) *Analytical Biochemistry*, 202 (146-151).
- [106] A. Chan, E. P. Diamandis, M. Krajden (1993) *Analytical Chemistry*, 65 (158-163).
- [107] E. López, C. Chypre, B. Alpha, G. Mathis (1993) *Clinical Chemistry (Washington D.C.)*, 39 (196-201).
- [108] S. Bortolin, T. K. Christopoulos, M. Verhaegen (1996) *Analytical Chemistry*, 68 (834-840).
- [109] K. Watanabe, H. Arakawa, M. Maeda (2002) *Luminescence*, 17 (123-129).
- [110] T. Jackson, S. Dakubu, R. P. Ekvis (1983) *Medical Laboratory World* (23, 25-28, 75).
- [111] L. E. Morrison (1988) *Analytical Biochemistry*, 174 (101-120).
- [112] Y. Xu, I. A. Hemmila, T. N. E. Loevgren (1992) *The Analyst*, 117 (1061-1069).
- [113] C. P. Price (1998) *Clinical Chemistry (Washington D.C.)*, 44 (2071-2074).
- [114] C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien (1997) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 226 (135-138).
- [115] E. Soini, T. Lovgren (1987) *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 18 (105-154).
- [116] L. Y. Dong (1992) *Yankuang Ceshi*, 11 (58-62).
- [117] J. L. Yuan, K. Matsumoto (1998) *Bunseki Kagaku* (873-880).
- [118] V. Nagel (2000) *LaborPraxis*, 24 (38-39).
- [119] T. Berthoud, P. Decambox, B. Kirsch, P. Mauchien, C. Moulin (1989) *Analytica Chimica Acta*, 220 (235-241).
- [120] L. Pan, X. Dong, L. Liu, H. Li, H. Chen (1989) *Fenxi Huaxue*, 17 (799-803).
- [121] L. H. Pan, S. Y. Wang, X. M. Dong (1997) *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, 17 (113-117).
- [122] L. H. Pan, X. M. Dong, J. X. Du, S. Y. Wang (1995) *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, 15 (17-21).
- [123] I. Hemmila (1985) *Analytical Chemistry*, 57 (1676-1681).
- [124] L. Pan, J. Du, J. Lian (1992) *Fenxi Huaxue*, 20 (571-574).
- [125] Z. Shen, Y. Zhang, D. Guo, Y. Huang (1991) *Fenxi Huaxue*, 19 (1075-1077).
- [126] C. Moulin, S. Rougeault, D. Hamon, P. Mauchien (1993) *Applied Spectroscopy*, 47 (2007-2012).

- [127] **C. Moulin, P. Decambox, L. Trecani (1996)** *Analytica Chimica Acta*, 321 (121-126).
- [128] **T. Berthoud, P. Decambox, B. Kirsch, P. Mauchien, C. Moulin (1988)** *Analytical Chemistry*, 60 (1296-1299).
- [129] **P. Thouvenot, S. Hubert, C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien (1993)** *Radiochimica Acta*, 61 (15-21).
- [130] **U. Panne, R. E. Neuhauser, M. Theisen, H. Fink, R. Niessner (2001)** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56B (839-850).
- [131] **H. Wimmer, J. I. Kim, R. Klenze (1992)** *Radiochimica Acta*, 58-59 (165-171).
- [132] **C. Moulin, P. Decambox, V. Moulin, J. G. Decaillon (1995)** *Analytical Chemistry*, 67 (348-353).
- [133] **L. Couston, D. Pouyat, C. Moulin, P. Decambox (1995)** *Applied Spectroscopy*, 49 (349-353).
- [134] **C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien, D. Pouyat, L. Couston (1996)** *Analytical Chemistry*, 68 (3204-3209).
- [135] **G. Meinrath (1997)** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 224 (119-126).
- [136] **S. Scapolan, E. Ansoborlo, C. Moulin, C. Madic (1997)** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 226 (145-148).
- [137] **C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre (1998)** *Applied Spectroscopy*, 52 (528-535).
- [138] **Z. M. Wang, J. M. Zachara, W. Yantasee, P. L. Gassman, C. X. Liu, A. G. Joly (2004)** *Environmental Science and Technology*, 38 (5591-5597).
- [139] **G. Planque, V. Moulin, P. Toulhoat, C. Moulin (2003)** *Analytica Chimica Acta*, 478 (11-22).
- [140] **K. A. Ghaleb, F. Viala, F. Miserque, L. Salmon, P. Reiller, G. Moutiers (2008)** *Applied Spectroscopy*, 62 (213-219).
- [141] **Y. Takahashi, T. Kimura, Y. Kato, Y. Minai (1999)** *Environmental Science and Technology*, 33 (4016-4021).
- [142] **J. Li, G. Chen, Y. Zeng (1990)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 336 (139-142).
- [143] **Y. Y. Xu, I. A. Hemmila (1992)** *Talanta*, 39 (759-763).
- [144] **J. J. Li, Y. E. Zeng, G. Q. Chen (1992)** *Yankuang Ceshi*, 11 (315-317).
- [145] **M. K. Carroll, F. V. Bright, G. M. Hieftje (1989)** *Analytical Chemistry*, 61 (1768-1772).
- [146] **J. Li, G. Chen, Y. Zeng (1993)** *Henliang Fenxi*, 9 (53-56).
- [147] **J. M. Hu, Q. A. Hu, G. Q. Chen, J. J. Li, Y. E. Zeng (1994)** *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, 14 (7-4).
- [148] **T. Matsuya, N. Hoshino, T. Okuyama (2006)** *Current Analytical Chemistry*, 2 (397-410).
- [149] **R. S. Addleman, C. M. Wai (2000)** *Analytical Chemistry*, 72 (2109-2116).
- [150] **L. Pan, J. Du, L. Liu, J. Lian (1991)** *Fenxi Huaxue*, 19 (1392-1394).
- [151] **S. K. Ho, N. H. Cheung (2005)** *Analytical Chemistry*, 77 (193-199).

- [152] **R. C. Rodríguez Díaz, J. M. Fernández Romero, M. P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens (2006)** *Analytica Chimica Acta*, 578 (220-226).
- [153] **R. C. Rodríguez Díaz, J. M. Fernández Romero, M. P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens (2006)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (9670-9676).
- [154] **M. A. Bacigalupo, A. Ius, R. Longhi, G. Meroni (2000)** *The Analyst*, 125 (1847-1850).
- [155] **M. Koresawa, K. Kikuchi, S. Mizukami, H. Kojima, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano (2000)** *Analytical Chemistry*, 72 (4904-4907).
- [156] **T. Ozaki, M. Arisaka, T. Kimura, A. J. Francis, Z. Yoshida (2002)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374 (1101-1104).
- [157] **C. Moulin, C. Larpent, D. Gazeau (1999)** *Analytica Chimica Acta*, 378 (47-54).
- [158] **C. Moulin, J. Wei, I. P. van, I. Laszak, G. Plancque, V. Moulin (1999)** *Analytica Chimica Acta*, 396 (253-261).
- [159] **K. H. Chung, W. Lee, Y. H. Cho, G. S. Choi, C. W. Lee (2005)** *Talanta*, 65 (389-395).
- [160] **Z. Liu, S. K. Xu, S. L. Sun, D. Z. Yang (2008)** *Fenxi Shiyanshi*, 27 (1-4).
- [161] **W. L. Cao, Y. L. Yu, S. K. Xu, X. J. Zhang (2010)** *Fenxi Ceshi Xuebao*, 29 (147-151).
- [162] **W. L. Cao, Y. L. Yu, S. K. Xu, N. Z. Wang (2010)** *Fenxi Shiyanshi*, 29 (6-9).
- [163] **T. Takeuchi, M. Yoshida, Y. Kabasawa, M. Ritsuko, E. Tamiya, I. Karube (1993)** *Analytical Letters*, 26 (1535-1545).
- [164] **Z. Y. Guo, Z. Tian, Y. L. Jia (2004)** *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, 24 (596-599).
- [165] **F. B. Wu, C. Zhan (2002)** *Analytical Biochemistry*, 311 (57-67).
- [166] **F. B. Wu, S. Q. Han, C. Zhang, Y. F. He (2002)** *Analytical Chemistry*, 74 (5882-5889).
- [167] **P. von Lode, J. Rosenberg, K. Pettersson, H. Takalo (2003)** *Analytical Chemistry*, 75 (3193-3201).
- [168] **L. Kokko, K. Sandberg, T. Lovgren, T. Soukka (2004)** *Analytica Chimica Acta*, 503 (155-162).
- [169] **Y. Kurosu, T. Iwata, A. Tsuji, M. Maeda (1997)** *Journal of Chromatography*, 787 (261-265).
- [170] **K. Matsumoto, Y. Tsukahara, T. Uemura, K. Tsunoda, H. Kume, S. Kawasaki, J. Tadano, T. Matsuya (2002)** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 773 (135-142).
- [171] **T. Matsuya, N. Hoshino, T. Harita, M. Ogasawara, S. Arao (2002)** *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25 (2807-2820).
- [172] **T. Iwata, J. Koshoubu, Y. Kurosu, T. Araki (1999)** *Journal of Chromatography*, 859 (13-21).
- [173] **E. Waddell, S. Lassiter, C. V. J. Owens, S. A. Soper (2000)** *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 23 (1139-1158).

- [174] **M. Latva, T. Ala-Kleme, H. Bjennes, J. Kankare, K. Haapakka (1995)** *The Analyst*, 120 (367-372).
- [175] **E. Hegazi, A. Hamdan, J. Mastromarino (2001)** *Applied Spectroscopy*, 55 (202-207).
- [176] **E. Hegazi, A. Hamdan (2002)** *Talanta*, 56 (989-995).
- [177] **W. Schade, J. Bublitiz (1996)** *Environmental Science and Technology*, 30 (1451-1458).
- [178] **D. Hayashi, W. Hoebe, G. Dooms, V. E. van, W. Rutgers, G. Kroessen (2001)** *Applied Optics*, 40 (986-993).
- [179] **J. H. Richardson, K. M. Larson, G. R. Haugen, D. C. Johnson, J. E. Clarkson (1980)** *Analytica Chimica Acta*, 116 (407-411).
- [180] **Y. Tang, W. Wang (1990)** *Fenxi Huaxue*, 18 (962-965).
- [181] **K. M. Bark, R. K. Force (1991)** *Talanta*, 38 (181-188).
- [182] **A. J. Bystol, A. D. Campiglia, G. D. Gillispie (2001)** *Analytical Chemistry*, 73 (5762-5770).
- [183] **A. J. Bystol, S. J. Yu, A. D. Campiglia (2003)** *Talanta*, 60 (449-458).
- [184] **R. Niessner, W. Robers, A. Krupp (1991)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 341 (207-213).
- [185] **U. Panne, A. Knoeller, R. Kotzick, R. Niessner (2000)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366 (408-414).
- [186] **R. Niessner, W. Robers, A. Krupp (1989)** *Fresenius' Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 333 (708-709).
- [187] **R. Niessner, U. Panne, H. Schroeder (1991)** *Analytica Chimica Acta*, 255 (231-243).
- [188] **R. Kotzick, R. Niessner (1996)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354 (72-76).
- [189] **S. M. Rudnick, R. F. Chen (1998)** *Talanta*, 47 (907-919).
- [190] **J. L. Whitcomb, A. J. Bystol, A. D. Campiglia (2002)** *Analytica Chimica Acta*, 464 (261-272).
- [191] **S. M. Inman, P. Thibado, G. A. Theriault, S. H. Lieberman (1990)** *Analytica Chimica Acta*, 239 (45-51).
- [192] **U. Panne, F. Lewitzka, R. Niessner (1992)** *Analisis*, 20 (533-542).
- [193] **A. J. Bystol, J. L. Whitcomb, A. D. Campiglia (2001)** *Environmental Science and Technology*, 35 (2566-2571).
- [194] **W. B. Wilson, A. D. Campiglia (2011)** *Analyst (Cambridge, U. K.)*, 136 (3366-3374).
- [195] **K. D. Ashby, K. Das, J. W. Petrich (1997)** *Analytical Chemistry*, 69 (1925-1930).
- [196] **I. Litani-Barzilai, V. Bulatov, V. V. Gridin, I. Schechter (2004)** *Analytica Chimica Acta*, 501 (151-156).
- [197] **S. Draxler, M. E. Lippitsch (1996)** *Applied Optics*, 35 (4117-4123).
- [198] **S. H. Lieberman, S. M. Inman, G. A. Theriault (1989)** *Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering*, 1172 (94-98).

- [199] **R. B. Thompson (1991)** *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 2 (345-365).
- [200] **S. Draxler, M. E. Lippitsch (1996)** *Analytical Chemistry*, 68 (753-757).
- [201] **C. A. Browne, D. H. Tarrant, M. S. Olteanu, J. W. Mullens, E. L. Chronister (1996)** *Analytical Chemistry*, 68 (2289-2295).
- [202] **G. Gauglitz (2005)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (141-155).
- [203] **O. S. Wolfbeis (2008)** *Analytical Chemistry*, 80 (4269-4283).
- [204] **S. Draxler, M. E. Lippitsch, M. J.-P. Leiner (1993)** *Sensors and Actuators B: Chemical*, B11 (421-424).
- [205] **S. Draxler, M. E. Lippitsch (1995)** *Sensors and Actuators B: Chemical*, B29 (199-203).
- [206] **G. Liebsch, I. Klimant, C. Krause, O. S. Wolfbeis (2001)** *Analytical Chemistry*, 73 (4354-4363).
- [207] **S. Mottin, C. Tran-Minh, P. Laporte, R. Cespuglio, M. Juvet (1993)** *Applied Spectroscopy*, 47 (590-597).
- [208] **K. Kurihara, M. Ohtsu, T. Yoshida, T. Abe, H. Hisamoto, K. Suzuki (1999)** *Analytical Chemistry*, 71 (3558-3566).
- [209] **K. Kurihara, M. Ohtsu, T. Yoshida, T. Abe, H. Hisamoto, K. Suzuki (2001)** *Analytica Chimica Acta*, 426 (11-18).
- [210] **D. J. S. Birch, O. J. Rolinski, D. Hatrick (1996)** *Review of Scientific Instruments*, 67 (2732-2737).
- [211] **M. Turel, A. Duerkop, A. Yegorova, Y. Scripinets, A. Lobnik, N. Samec (2009)** *Analytica Chimica Acta*, 644 (53-60).
- [212] **J. F. Gouin, F. Baros, D. Birot, J. C. Andre (1997)** *Sensors and Actuators B: Chemical*, B39 (401-406).
- [213] **M. Schäferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, O. S. Wolfbeis (2003)** *Applied Spectroscopy*, 57 (1386-1392).
- [214] **W. Lei, A. Dürkop, Z. H. Lin, M. Wu, O. S. Wolfbeis (2003)** *Mikrochimica Acta*, 143 (269-274).
- [215] **A. Bartolomé, C. Bardliving, G. Rao, L. Tolosa (2005)** *Analytical Biochemistry*, 345 (133-139).
- [216] **D. Zhu, Y. Chen, L. P. Jiang, J. Geng, J. R. Zhang, J. J. Zhu (2011)** *Analytical Chemistry*, 83 (9076-9087).
- [217] **Y. S. Xia, C. Q. Zhu (2008)** *Talanta*, 75 (215-221).
- [218] **H. Goncalves, P. A. S. Jorge, J. R. A. Fernandes, J. C. G. Esteves da Silva (2010)** *Sensors and Actuators, B*, 145 (702-707).
- [219] **Y. S. Xia, C. Q. Zhu (2008)** *Analyst (Cambridge, U. K.)*, 133 (928-932).
- [220] **T. Kimura (1999)** *Bunseki Kagaku* (246-247).
- [221] **F. V. Bright, G. H. Vickers, G. M. Hieftje (1986)** *Analytical Chemistry*, 58 (1225-1227).
- [222] **A. Nevin, D. Comelli, G. Valentini, D. Anglos, A. Burnstock, S. Cather, R. Cubeddu (2007)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (1897-1905).
- [223] **A. Nevin, S. Cather, A. Burnstock, D. Anglos (2008)** *Applied Spectroscopy*, 62 (481-489).

- [224] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, I. Sánchez-Ferrer Robles (2011)** *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79 (909-914).
- [225] **C. Huber, I. Klimant, C. Krause, T. Werner, T. Mayr, O. S. Wolfbeis (2000)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368 (196-202).
- [226] **C. Huber, I. Klimant, C. Krause, O. S. Wolfbeis (2001)** *Analytical Chemistry*, 73 (2097-2103).
- [227] **C. Huber, I. Klimant, C. Krause, T. Werner, O. S. Wolfbeis (2001)** *Analytica Chimica Acta*, 449 (81-93).
- [228] **T. Mayr, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, T. Werner (2002)** *Analytica Chimica Acta*, 462 (1-10).
- [229] **G. J. Mohr, I. Klimant, U. E. Spichiger-Keller, O. S. Wolfbeis (2001)** *Analytical Chemistry*, 73 (1053-1056).
- [230] **S. M. Borisov, G. Neurauter, C. Schroeder, I. Klimant, O. S. Wolfbeis (2006)** *Applied Spectroscopy*, 60 (1167-1173).
- [231] **K. Waich, S. Borisov, T. Mayr, I. Klimant (2009)** *Sensors and Actuators, B*, 139 (132-138).
- [232] **S. Schreml, R. J. Meier, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R. M. Szeimies, P. Babilas (2001)** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2432-2437).
- [233] **C. von Bueltingsloewen, A. K. McEvoy, C. McDonagh, B. D. MacCraith, I. Klimant, C. Krause, O. S. Wolfbeis (2002)** *Analyst*, 127 (1478-1483).
- [234] **T. Mayr, C. Igel, G. Liebsch, I. Klimant, O. S. Wolfbeis (2003)** *Analytical Chemistry*, 75 (4389-4396).
- [235] **W. Spendley, F. R. Hext, F. R. Himsworth (1962)** *Technometrics*, 4 (441-461).
- [236] **J. A. Nelder, R. Mead (1965)** *The Computer Journal*, 7 (308-313).
- [237] **P. B. Ryan, R. L. Barr, H. D. Todd (1980)** *Analytical Chemistry*, 52 (1460-1467).
- [238] **D. M. Haaland, E. V. Thomas (1988)** *Analytical Chemistry*, 60 (1193 - 1202).
- [239] **D. M. Haaland, E. V. Thomas (1988)** *Analytical Chemistry*, 60 (1202 - 1208).
- [240] **(1978)** *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 33 (242-245).
- [241] **H. H. Kaiser (1970)** *Analytical Chemistry*, 42 (26A-59a).
- [242] **G. L. Long, J. D. Winefordner (1983)** *Analytical Chemistry*, 55 (712A-724A).
- [243] **C. A. Clayton, J. W. Hines, P. D. Elkins (1987)** *Analytical Chemistry*, 59 (2506-2514).
- [244] **M. Ostra, C. Ubide, M. Vidal, J. Zuriarrain (2008)** *The Analyst*, 133 (532 - 539).
- [245] **A. C. Olivieri (2002)** *Journal of Chemometrics*, 16 (207 - 217).
- [246] **A. C. Olivieri, N. M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J. H. Kalivas, H. Mark (2006)** *Pure and Applied Chemistry*, 78 (633 - 661).
- [247] **D. W. Marquardt (1963)** *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11 (431-441).

- [248] **J. N. Demas (1983)** Excited State Lifetime Measurements, *Academic Press*, New York.
- [249] **D. V. O'Connor, D. Phillips (1984)** Time-Correlated Single Photon Counting, *Academic Press*, London.
- [250] **D. F. Eaton (1990)** *Pure and Applied Chemistry*, 62 (1631-1648).
- [251] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, E. Jiménez García, J. M. Murillo Gómez (2010)** 7th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2010), Lesvos (Greece).
- [252] **A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, F. A. Iñón (2004)** *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 73 (189-197).
- [253] **D. B. Owen (1962)** Handbook of Statistical Tables, *Addison Wesley: Reading*, Massachusetts.
- [254] **P. Fernández López (2000)** Determinaciones fotoluminiscentes de agentes dopantes, Tesis Doctoral, *Universidad de Castilla-La Mancha*, Ciudad Real.
- [255] **H. de Ruyck, H. de Ridder (2007)** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (1511-1520).
- [256] **Z. Yue, Y. Qiu, X. Liu, C. Ji (2006)** *Fenxi Huaxue*, 34 (1255-1259).
- [257] **Z. F. Yue, W. P. Zheng, L. Q. Xie, C. N. Ji, P. J. Chen (2006)** *Fenxi shiyanshi*, 25 (24-28).
- [258] **G. F. Pang, Y. Z. Cao, J. J. Zhang, G. Q. Jia, C. L. Fan, X. M. Li (2005)** *Fenxi Ceshi Xuebao*, 24 (61-63).
- [259] **Y. Wen, Y. Wang, Y. Q. Feng (2006)** *Talanta*, 70 (153-159).
- [260] **T. Charoenraks, S. Chuanuwatanakul, K. Honda, Y. Yamaguchi, O. Chailapakul (2005)** *Analytical Sciences*, 21 (241-245).
- [261] **S. Yang, J. Cha, K. Carlson (2005)** *Journal of Chromatography A*, 1097 (40-53).
- [262] **L. Monser, F. Darghouth (2000)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (353-362).
- [263] **L. F. Wang, J. D. Peng, L. M. Liu (2008)** *Analytica Chimica Acta*, 630 (101-106).
- [264] **X. Q. Wei, Z. F. Liu, S. P. Liu (2006)** *Acta Chimica Sinica*, 64 (521-526).
- [265] **M. C. Vargas Mamani, J. Amaya Farfán, F. G. Reyes Reyes, S. Rath (2006)** *Talanta*, 70 (236-243).
- [266] **C. L. Chen, X. Gu (1995)** *Journal of AOAC International*, 78 (1369-1377).
- [267] **Z. Gong, Z. Zhang (1997)** *Analytica Chimica Acta*, 351 (205-210).
- [268] **F. Álava Moreno, M. E. Díaz García, A. Sanz Medel (1993)** *Analytica Chimica Acta*, 281 (637-644).
- [269] **W. Liu, Y. Wang, J. Tang, G. Shen, R. Yu (1998)** *Analyst*, 123 (365-369).
- [270] **L. X. Chen, C. G. Niu, G. M. Zeng, G. H. Huang, G. L. Shen, R. Q. Yu (2003)** *Analytical Sciences*, 19 (295-298).
- [271] **L. W. Zhang, L. Luo, C. Q. Jiang, J. M. Shi (2008)** *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36 (1547-1550).
- [272] **P. Feng, Y. F. Li, C. Z. Huang (2001)** *Analytica Chimica Acta*, 442 (89-95).

- [273] **T. J. Wenzel, L. M. Collette, D. T. Dahlen, S. M. Hendrickson, L. W. Yarmaloff (1988)** *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, 433 (149-158).
- [274] **E. V. Thomas, D. M. Haaland (1990)** *Analytical Chemistry*, 62 (1091-1099).
- [275] **J. Mandel, F. J. Linning (1957)** *Analytical Chemistry*, 29 (743-749).
- [276] **J. A. Murillo Pulgarín, L. F. García Bermejo, M. N. Sánchez García (2007)** *Analytica Chimica Acta*, 602 (66-74).
- [277] **M. J. P. Leiner, M. R. Hubmann, O. S. Wolfbeis (1987)** *Analytica Chimica Acta*, 198 (13-23).
- [278] **L. Bettaieb, J. J. Aaron (2001)** *Turkish Journal of Chemistry*, 25 (165-171).
- [279] **M. El-Sadek, M. Baraka, K. A. Aboul (1987)** *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 (97-00).
- [280] **M. S. Mahrous, M. M. Abdel-Khalek, M. E. Abdel-Hamid (1985)** *Talanta*, 32 (651-653).
- [281] **S. T. Hassib, H. M. Safwat, R. I. El-Bagry (1987)** *Egyptian Journal Pharmaceutical Sciences*, 28 (203-214).
- [282] **M. H. Abdel-Hay, M. A. Korany, M. M. Bedair, A. A. Gazy (1990)** *Analytical Letters*, 23 (281-294).
- [283] **S. M. Hassan, S. A. M. Shaaban (1984)** *Die Pharmazie*, 39 (691-693).
- [284] **A. S. Issa, Y. A. Beltagy, M. G. Kassem, H. G. Daabees (1985)** *Talanta*, 32 (209-211).
- [285] **S. T. Hassib, H. M. Safwat, R. I. El-Bagry (1986)** *The Analyst*, 111 (45-48).
- [286] **A. A. Khier, M. El-Sadek, M. Baraka (1987)** *The Analyst*, 112 (1399-1403).
- [287] **A. S. Issa, Y. A. Beltagy, M. G. Kassem, H. G. Daabes (1987)** *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (59-65).
- [288] **T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, A. Sanz, E. Bravo (1998)** *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 708 (249-256).
- [289] **M. Polasek, M. Pospisilova, M. Urbanek (2000)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (135-142).
- [290] **F. A. Aly, F. Belal (1994)** *Die Pharmazie*, 49 (454-455).
- [291] **G. Alpdogan, S. Sungur (1999)** *Analytical Letters*, 32 (2799-2808).
- [292] **C. K. Lin, C. S. Lee, J. H. Perrin (1980)** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (95-97).
- [293] **K. Suenami, L. W. Lim, T. Takeuchi, Y. Sasajima, K. Sato, Y. Takekoshi, S. Kanno (2006)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (1501-1505).
- [294] **K. Suenami, L. W. Lim, T. Takeuchi, Y. Sasajima, K. Sato, Y. Takekoshi, S. Kanno (2006)** *Journal of Separation Science*, 29 (2725-2732).
- [295] **K. Suenami, L. W. Lim, T. Takeuchi, Y. Sasajima, K. Sato, Y. Takekoshi, S. Kanno (2007)** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846 (176-183).
- [296] **K. Shimada, M. Nakajima, H. Wakabayashi, S. Yamato (1989)** *Bunseki Kagaku*, 38 (632-635).

- [297] I. N. Papadoyannis, A. C. Zotou, V. F. Samanidou (1992) *Journal of Liquid Chromatography*, 15 (1923-1945).
- [298] E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, K. Inagaki, H. Ishihara, M. Nishida (2000) *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 744 (81-89).
- [299] H. J. Battista, G. Wehinger, R. Henn (1985) *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, 345 (77-89).
- [300] S. M. R. Stanley, N. A. Owens, J. P. Rodgers (1995) *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 667 (95-103).
- [301] E. N. M. Ho, D. K. K. Leung, T. S. M. Wan, N. H. Yu (2006) *Journal of Chromatography*, 1120 (38-53).
- [302] S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, R. Ventura, J. Segura (1996) *Analytical Chemistry*, 68 (118-123).
- [303] U. M. Laakkonen, A. Leinonen, L. Savonen (1994) *Analyst*, 119 (2695-2696).
- [304] T. Shinozuka, S. Takei, N. Kuroda, K. Kurihara, J. Yanagida (1991) *Eisei Kagaku*, 37 (461-466).
- [305] K. Hoshina, S. Horiyama, H. Matsunaga, J. Haginaka (2011) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (916-922).
- [306] E. Dubreil-Chéneau, Y. Pirotais, M. Bessiral, B. Roudaut, E. Verdon (2011) *Journal of Chromatography A*, 1218 (6292-6301).
- [307] C. Giachetti, A. Assandri, G. Zanollo, A. Tenconi (1994) *Chromatographia*, 39 (162-169).
- [308] G. González, R. Ventura, A. K. Smith, R. De La Torre, J. Segura (1996) *Journal of Chromatography A*, 719 (251-264).
- [309] A. Takeda, H. Tanaka, T. Shinohara, I. Ohtake (2001) *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications*, 758 (235-248).
- [310] K. R. Kim, Y. J. Shin, W. H. Shim, S. W. Myung (1994) *Archives of Pharmacal Research*, 17 (175-181).
- [311] S. W. Myung, J. H. Park, M. S. Kim, H. W. Cho (1999) *Analytical Science and Technology (Bunseog gwahag)*, 12 (571-576).
- [312] H. H. Maurer, F. X. Tauvel, T. Kraemer (2001) *Journal of Analytical Toxicology*, 25 (237-244).
- [313] K. R. Kim, W. H. Shim, Y. J. Shin, J. Park, S. Myung, J. Hong (1993) *Journal of Chromatography*, 641 (319-327).
- [314] K. R. Kim, H. R. Yoon (1996) *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 682 (55-66).
- [315] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillán, A. Prieto (2008) *Talanta*, 75 (111-115).
- [316] N. K. Jagota, J. T. Stewart (1992) *Journal of Chromatography*, 604 (255-260).
- [317] F. A. Aly, S. A. Al-Tamini, A. A. Alwarthan (2000) *Analytica Chimica Acta*, 416 (87-96).
- [318] R. Huang, X. Xu (1989) *Yaoxue Xuebao*, 24 (37-42).

- [319] **M. I. Albero, P. C. Sanchez, M. S. Garcia (1995)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13 (1113-1117).
- [320] **S. M. Sabry (1998)** *Analytica Chimica Acta*, 367 (41-53).
- [321] **A. Pedraza, M. D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez Bendito (2004)** *Analytica Chimica Acta*, 522 (89-97).
- [322] **T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomas, J. Carpena (1998)** *Talanta*, 47 (537-545).
- [323] **L. F. Capitán Valvey, N. Navas, M. del Olmo, V. Consonni, R. Todeschini (2000)** *Talanta*, 52 (1069-1079).
- [324] **A. Muñoz de La Peña, A. Espinosa Mansilla, N. Mora Díez, D. Bohoyo Gil, A. C. Olivieri, G. M. Escandar (2006)** *Applied Spectroscopy*, 60 (330-338).
- [325] **F. Vinci, S. Fabbrocino, M. Fiori, L. Serpe, P. Gallo (2006)** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (3412-3420).
- [326] **P. Gallo, S. Fabbrocino, F. Vinci, M. Fiori, V. Danese, A. Nasi, L. Serpe (2006)** *Journal of Chromatographic Science*, 44 (585-590).
- [327] **P. Gallo, S. Fabbrocino, F. Vinci, M. Fiori, V. Danese, L. Serpe (2008)** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (841-854).
- [328] **P. Gallo, S. Fabbrocino, G. Dowling, M. Salini, M. Fiori, G. Perretta, L. Serpe (2010)** *Journal of Chromatography, A*, 1217 (2832-2839).
- [329] **T. Peng, J. Yu, M. Yan, X. J. Li, D. D. Chen, H. H. Dai, W. Guo, S. J. Li, Y. Z. Tang (2009)** *Fenxi Huaxue*, 37 (363-368).
- [330] **K. Reddersen, T. Heberer (2003)** *Journal of Separation Science*, 26 (1443-1450).
- [331] **M. Liu (1990)** *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 25 (350-351).
- [332] **W. Gao, Y. Sha, Y. Cui (1987)** *Shenyang Yaoxueyuan Xuebao*, 4 (265-269).
- [333] **G. K. Reddy, J. V. L. N. S. Rao, R. L. B. Varma, D. G. Sankar (2001)** *Indian Drugs*, 38 (336-337).
- [334] **A. O. Adegoke, S. O. Idowu, A. A. Olaniyi (2007)** *African journal of medicine and medical sciences*, 36 (249-257).
- [335] **N. O. Can, M. Tuncel, H. Y. Aboul-Enein (2003)** *Die Pharmazie*, 58 (22-24).
- [336] **H. L. Ma, X. Y. Ding, M. T. Xu, C. X. Ling (2006)** *Fenxi Kexue Xuebao*, 22 (212-215).
- [337] **Y. Altun, B. Dogan, S. A. Ozkan, B. Uslu (2007)** *Acta Chimica Slovenica*, 54 (287-294).
- [338] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, I. Sánchez-Ferrer Robles (2005)** *Analytica Chimica Acta*, 554 (37-42).
- [339] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, M. T. Alañón Pardo (2005)** *Analytical Biochemistry*, 339 (157-164).
- [340] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, M. T. Alañón Pardo (2005)** *Analytica Chimica Acta*, 528 (77-82).
- [341] **P. Li, Y. J. Ning (1993)** *Yaowu Fenxi Zazhi*, 13 (96-97).
- [342] **M. Starek, J. Krzek (2009)** *Talanta*, 77 (925-942).

- [343] **J. E. Ray, R. O. Day (1984)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 37 (234-238).
- [344] **I. F. Al-Momani (1997)** *Analytical Letters*, 30 (2485-2492).
- [345] **R. T. Sane, M. K. Patel, U. D. Kulkarni, V. B. Tirodkar (1993)** *Indian Drugs*, 30 (468-472).
- [346] **F. G. Xiong, R. Y. Wang, K. Liu (2000)** *Yaowu Fenxi Zazhi*, 20 (176-178).
- [347] **J. Fu, Y. Q. Zhang, D. Y. Xu (1999)** *Yaowu Fenxi Zazhi*, 19 (345-347).
- [348] **Y. Zhao, X. J. Zhe, N. Wang (1999)** *Yaowu Fenxi Zazhi*, 19 (139-140).
- [349] **A. Haque, J. T. Stewart (1999)** *Biomedical Chromatography*, 13 (51-56).
- [350] **Y. F. Cheng, T. H. Walter, Z. L. Lu, P. Iraneta, B. A. Alden, C. Gendreau, U. D. Neue, J. F. Grassi, J. L. Carmody, J. E. O'Gara, R. P. Fisk (2000)** *LC GC - North America - Solutions for Separation Scientists*, 18 (1162, 1164, 1166, 1168, 1170, 1172-).
- [351] **E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida (2000)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (917-925).
- [352] **A. D. de Jager, H. K. L. Hundt, A. F. Hundt, K. J. Swart, M. Knight, J. Roberts (2000)** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 740 (247-251).
- [353] **L. Q. Huang, C. F. Xu, Z. Zhang, Y. Li (1992)** *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 12 (198-199).
- [354] **E. J. Jang, Y. J. Lee, M. G. Park, C. K. Shim (1995)** *Analytical Letters*, 28 (2379-2389).
- [355] **Y. Qin, Y. Zou, M. Liang, Y. Huang, Q. Yu (1999)** *Journal of West China University of Medical Sciences*, 30 (452-454).
- [356] **L. Escuder Gilabert, Y. Martín Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva Camaño, M. J. Medina Hernández (2002)** *Chromatographia*, 55 (283-288).
- [357] **K. Kobylinska, M. Barlinska, M. Kobylinska (2003)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (323-328).
- [358] **M. Nobilis, J. Kopecký, J. Květina, Z. Svoboda, M. Pour, J. Kuneš, M. Holčapek, L. Kolářová (2003)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (641-656).
- [359] **M. Nobilis, M. Holčapek, L. Kolářová, L., J. Kopecký, M. Kuneš, Z. Svoboda, J. Květina (2004)** *Journal of Chromatography A*, 1031 (229-236).
- [360] **J. F. Sheen, G. R. Her (2004)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (891-897).
- [361] **R. N. Rao, S. Meena, D. Nagaraju, A. R. Rao (2005)** *Biomedical Chromatography*, 19 (362-368).
- [362] **S. M. R. Stanley, H. C. Foo (2006)** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 836 (1-4).
- [363] **B. N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal, A. Prasad, P. S. Shrivastav (2008)** *Biomedical Chromatography*, 22 (1213-1224).
- [364] **L. Nespěšná, M. Štícha, O. Matoušková, F. Perlík, O. Slanař (2011)** *Ceska a Slovenska Farmacie*, 60 (17-24).

- [365] **B. E. Cham, D. Johns, F. Bochner, D. M. Imhoff, M. Rowland (1979)** *Clinical Chemistry (Washington D.C.)*, 25 (1420-1425).
- [366] **E. N. Amick, W. D. Mason (1979)** *Analytical Letters*, 12 (629-640).
- [367] **D. L. Maulding, J. F. Young (1980)** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (1224-1226).
- [368] **U. Reidl (1983)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 23 (325-331).
- [369] **S. K. Bakar, S. Niazi (1983)** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72 (1020-1023).
- [370] **R. J. O'Kruk, M. A. Adams, R. B. Philp (1984)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 35 (343-352).
- [371] **D. C. Mays, D. E. Sharp, C. A. Beach, R. A. Kershaw, J. R. Bianchine, N. Gerber (1984)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 36 (301-309).
- [372] **J. Shen, S. Wanwimolruk, C. R. Clark, M. S. Roberts (1990)** *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 13 (751-761).
- [373] **J. Klimes, J. Sochor, M. Zahradnicek, J. Sedlacek (1992)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 122 (221-228).
- [374] **J. H. Liu, P. C. Smith (1996)** *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications*, 675 (61-70).
- [375] **I. K. Chun, B. I. Yoo, S. Song, Y. B. Chung (2005)** *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28 (2403-2419).
- [376] **S. Croubels, A. Maes, K. Baert, B. P. de (2005)** *Analytica Chimica Acta*, 529 (179-187).
- [377] **C. Legido-Quigley, N. W. Smith (2006)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (686-691).
- [378] **E. Yamamoto, S. Takakuwa, T. Kato, N. Asakawa (2007)** *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846 (132-138).
- [379] **X. Wang, L. L. Huang, D. M. Chen, A. Ihsan, Z. H. Yuan (2011)** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34 (410-416).
- [380] **M. Grootveld, B. Halliwell (1986)** *Biochemical Journal*, 237 (499-504).
- [381] **B. E. Cham, F. Bochner, D. M. Imhoff, D. Johns, M. Rowland (1980)** *Clinical Chemistry (Washington D.C.)*, 26 (111-114).
- [382] **P. O. Lagerstrom (1981)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 14 (476-481).
- [383] **N. Fornstedt (1982)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 19 (253-261).
- [384] **F. A. Ogunbona (1986)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 50 (471-474).
- [385] **B. V. Shetty, S. Melethil (1988)** *Analytical Letters*, 21 (395-410).
- [386] **S. Mallikaarjun, J. H. Wood, H. T. Karnes (1989)** *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 85 (93-04).

- [387] **K. F. Nielsen, J. Smedsgaard (2003)** *Journal of Chromatography*, 1002 (111-136).
- [388] **K. F. Nielsen, M. W. Sumarah, J. C. Frisvad, J. D. Miller (2006)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (3756-3763).
- [389] **M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre (1979)** *J. Pharm. Belg.*, 34 (317-328).
- [390] **J. M. Hardin, C. A. Stutte (1980)** *Analytical Biochemistry*, 102 (171-175).
- [391] **H. Yoshida, T. Mizukoshi, K. Hirayama, H. Miyano (2007)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (551-560).
- [392] **S. Weidner, R. Amarowicz, M. Karamac, G. Dabrowski (1999)** *European Food Research and Technology*, 210 (109-113).
- [393] **K. H. Kim, R. Tsao, R. Yang, S. W. Cui (2006)** *Food Chemistry*, 95 (466-473).
- [394] **R. Shakya, D. A. Navarre (2006)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5253-5260).
- [395] **M. N. Peyrat-Maillard, S. Bonnely, C. Berset (2000)** *Talanta*, 51 (709-716).
- [396] **M. R. A. Budi, F. L. Darsono, J. J. C. Scheffer, R. Verpoorte (2001)** *Journal of Chromatography*, 927 (39-45).
- [397] **M. Luczkiewicz, W. Cisowski, P. Kaiser, R. Ochocka, A. Piotrowski (2001)** *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58 (373-379).
- [398] **S. Floridi, L. Montanari, O. Marconi, P. Fantozzi (2003)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (1548-1554).
- [399] **D. W. Wen, C. C. Li, H. Di, Y. P. Liao, H. W. Liu (2005)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6624-6629).
- [400] **N. Fang, S. Yu., R. L. Prior (2002)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (3579-3585).
- [401] **F. A. Ayaz, S. Hayirioğlu-Ayaz, J. Gruz, O. Novak, M. Strnad (2005)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8116-8122).
- [402] **M. C. Herrera, M. D. Luque de Castro (2005)** *Journal of Chromatography*, 1100 (1-7).
- [403] **G. Cefarelli, B. D'Abrosca, A. Fiorentino, A. Izzo, C. Mastellone, S. Pacifico, V. Piscopo (2006)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (803-809).
- [404] **P. J. Woodring, P. A. Edwards, M. G. Chisholm (1990)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (729-732).
- [405] **Q. L. Zhang, H. Cui, A. Myint, M. Lian, L. J. Liu (2005)** *Journal of Chromatography*, 1095 (94-01).
- [406] **J. Gruz, O. Novak, M. Strnad (2008)** *Food Chemistry*, 111 (789-794).
- [407] **M. S. Shou, W. A. Galinada, Y. C. Wei, Q. L. Tang, R. J. Markovich, A. M. Rustum (2009)** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (356-361).
- [408] **J. A. Mongillo, J. Paul (1997)** *Microchemical Journal*, 55 (296-307).
- [409] **R. J. Robbins (2003)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2866-2887).

- [410] **R. Zadernowski, M. Nacz, J. Nesterowicz (2005)** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2118-2124).
- [411] **S. Tanchev, N. Ioncheva, N. Genov, E. Malichev (1980)** *Nahrung/Food*, 24 (251-253).
- [412] **H. B. Hong, Y. S. Chang, S. D. Choi, Y. H. Park (2000)** *Water Research*, 34 (2404-2407).
- [413] **M. Y. Jung, B. S. Jeon, J. Y. Bock (2002)** *Food Chemistry*, 79 (105-111).
- [414] **J. Jaroszynska (2003)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (702-708).
- [415] **J. Jaroszynska, T. Ligor (2005)** *Analytica Chimica Acta*, 539 (11-15).
- [416] **V. Isidorov, K. Rafalowski, V. Vinogorova, L. Reduta, I. Fuksman (2006)** *Chemical Analysis (Warsaw)*, 51 (79-87).
- [417] **C. Proestos, D. Sereli, M. Komaitis (2006)** *Food Chemistry*, 95 (44-52).
- [418] **I. D. Wilson (1986)** *Journal of Chromatography*, 354 (99-06).
- [419] **Y. A. Klyachko, V. S. Padalkina (1981)** *Pishch. Prom-st., Ser. I (Nauchno-Tekh. Ref. Sb.)* (23-26).
- [420] **S. P. Porras, M. L. Riekkola, E. Kenndler (2001)** *Electrophoresis*, 22 (3798-3804).
- [421] **S. P. Porras, M. L. Riekkola, E. Kenndler (2002)** *Electrophoresis*, 23 (367-374).
- [422] **C. X. Xue, X. J. Yao, H. X. Liu, M. C. Liu, Z. D. Hu, B. T. Fan (2005)** *Electrophoresis*, 26 (2154-2164).
- [423] **Q. J. Wang, F. Ding, N. N. Zhu, H. Li, P. G. He, Y. Z. Fang (2003)** *Journal of Chromatography*, 1016 (123-128).
- [424] **K. Kanitsar, L. Arce, A. Rios, M. Valcarcel (2001)** *Electrophoresis*, 22 (1553-1560).
- [425] **Y. K. Zeng, Z. X. Tang, Q. J. Wang, P. G. He, Y. Z. Fang (2007)** *Journal of Chromatographic Science*, 45 (610-615).
- [426] **J. R. Petersen, M. G. Bissell, A. A. Mohammad (1996)** *Journal of Chromatography*, 744 (37-44).
- [427] **F. Salinas, A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, M. S. Durán (1990)** *The Analyst*, 115 (1007-1011).
- [428] **P. Damiani, M. E. Ribone, G. Ibáñez, A. C. Olivieri (1995)** *The Analyst*, 120 (443-445).
- [429] **D. G. Konstantianos, P. C. Ioannou (1992)** *The Analyst*, 117 (877-882).
- [430] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina (1994)** *The Analyst*, 119 (1915-1919).
- [431] **J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina (1996)** *Analytica Chimica Acta*, 319 (361-368).
- [432] **A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, M. D. Moreno, F. Salinas, M. Martínez Galera (1995)** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351 (571-576).

- [433] A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, M. D. Moreno, F. Salinas, M. Martínez Galera (1995) *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 353 (211-214).
- [434] J. C. G. Esteves da Silva, S. A. G. Novais (1998) *The Analyst*, 123 (2067-2070).
- [435] H. L. Wu, N. Long, Y. F. Fang, C. Y. Mo, R. Q. Yu (2002) *Fenxi shiyanshi*, 21 (44-47).
- [436] X. W. Huang, Y. Z. Cao, H. Chen (2003) *Fenxi Ceshi Xuebao*, 22 (35-38).
- [437] J. R. Lakowicz (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York (97-204).
- [438] M. Schäferling, A. Dürkop (2008) Springer Series on Fluorescence, Springer, Berlin, Heidelberg (373-414).
- [439] H. H. Gorris, R. Ali, S. M. Saleh, O. S. Wolfbeis (2011) *Advanced Materials*, 23 (1652-1655).
- [440] X. D. Wang, H. H. Gorris, J. A. Stolwijk, R. J. Meier, D. B. M. Groegel, J. Wegener, O. S. Wolfbeis (2011) *Chemical Science*, 2
- [441] E. N. Chaney, R. P. Baldwin (1985) *Analytica Chimica Acta*, 176 (105-112).
- [442] M. G. Trevisan, R. J. Poppi (2003) *Analytica Chimica Acta*, 493 (69-81).
- [443] A. Gavenda, J. Sevcik, J. Psotova, P. Bednar, P. Bartak, P. Adamovsky, V. Simanek (2001) *Electrophoresis*, 22 (2782-2785).
- [444] A. R. Eder, J. S. Chen, E. A. Arriaga (2006) *Electrophoresis*, 27 (3263-3270).
- [445] T. Pérez Ruíz, C. Martínez Lozano, A. Sanz, E. Bravo (2001) *Electrophoresis*, 22 (134-138).
- [446] N. J. Reinhoud, U. R. Tjaden, H. Irth, J. Vandergreef (1992) *Journal of Chromatography*, 574 (327-334).
- [447] I. Badea, L. Lazar, D. Moja, D. Nicolescu, A. Tudose (2005) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (305-309).
- [448] O. T. Fahmy, M. A. Korany, H. M. Maher (2004) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34 (1099-1107).
- [449] Q. Y. Zhou, B. Chowbay (2002) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 (1063-1074).
- [450] C. M. Gilbert, R. P. McGeary, L. J. Filippich, R. L. G. Norris, B. G. Charles (2005) *Journal of Chromatography B*, 826 (273-276).
- [451] S. N. Mahnik, B. Rizovski, M. Fuerhacker, R. M. Mader (2006) *Chemosphere*, 65 (1419-1425).
- [452] L. Álvarez Cedrón, M. L. Sayalero, J. M. Lanao (1999) *Journal of Chromatography B*, 721 (271-278).
- [453] S. Fogli, R. Danesi, F. Innocenti, A. Di Paolo, G. Bocci, C. Barbara, M. Del Tacca (1999) *Therapeutic Drug Monitoring*, 21 (367-375).
- [454] P. de Bruijn, J. Verweij, W. J. Loos, H. J. Kolker, A. S. T. Planting, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom (1999) *Analytical Biochemistry*, 266 (216-221).

- [455] **J. van Asperen, O. van Tellingen, J. H. Beijnen (1998)** *Journal of Chromatography B*, 712 (129-143).
- [456] **K. Imai, A. Nishitani, Y. Tsukamoto (1987)** *Chromatographia*, 24 (77-81).
- [457] **S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda (2009)** *Talanta*, 78 (94-100).
- [458] **R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, A. Fattorossi, P. Zuccaro (1998)** *Journal of Chromatography B*, 707 (219-225).
- [459] **R. DiFrancesco, J. J. Griggs, J. Donnelly, R. DiCenzo (2007)** *Journal of Chromatography B*, 852 (545-553).
- [460] **F. Lachatre, P. Marquet, S. Ragot, J. M. Gaulier, P. Cardot, J. L. Dupuy (2000)** *Journal of Chromatography B*, 738 (281-291).
- [461] **C. Sottani, G. Tranfo, M. Bettinelli, P. Faranda, M. Spagnoli, C. Minoia (2004)** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (2426-2436).
- [462] **Y. H. Yang (2007)** *Talanta*, 71 (596-604).
- [463] **Y. H. Liu, Y. H. Yang, X. T. Liu, T. Jiang (2008)** *Talanta*, 74 (887-895).
- [464] **R. D. Arnold, J. E. Slack, R. M. Straubinger (2004)** *Journal of Chromatography B*, 808 (141-152).
- [465] **J. M. Kürner, I. Klimant, C. Krause, H. Preu, W. Kunz, O. S. Wolfbeis (2001)** *Bioconjugate Chemistry*, 12 (883-889).
- [466] **L. Boguslavsky, S. Baruch, S. Margel (2005)** *Journal of Colloid and Interface Science*, 289 (71-85).
- [467] **K. Landfester, M. Antonietti (2000)** *Macromolecular Rapid Communications*, 21 (820-824).
- [468] **P. Cole, J. S. Mandel, J. J. Collins (2008)** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 52 (342-351).
- [469] **C. T. Lin, W. Bottcher, M. Chou, C. Creutz, N. Sutin (1976)** *Journal of the American Chemical Society*, 98 (6536-6544).
- [470] **A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. Vonzelewsky (1988)** *Coordination Chemistry Reviews*, 84 (85-277).
- [471] **P. C. Alford, M. J. Cook, A. P. Lewis, G. S. G. Mcauliffe, V. Skarda, A. J. Thomson, J. L. Glasper, D. J. Robbins (1985)** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (705-709).
- [472] **K. K. Karukstis, E. H. Z. Thompson, J. A. Whiles, R. J. Rosenfeld (1998)** *Biophysical Chemistry*, 73 (249-263).
- [473] **M. Eriksson, B. Nordén, S. Eriksson (1988)** *Biochemistry*, 27 (8144-8151).
- [474] **X. Dai, Z. Yue, M. E. Eccleston, J. Swartling, N. K. H. Slater, C. F. Kaminski (2008)** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4 (49-56).
- [475] **J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers (1982)** *Biochemistry*, 21 (3927-3932).
- [476] **R. Bugat, J. Robert, A. Herrera, M. C. Pinel, S. Huet, C. Chevreau, G. Boussin, J. Roquain, M. Carton (1989)** *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 25 (505-511).